

ibvt-Schriftenreihe

Schriftenreihe des Instituts für
Bioverfahrenstechnik
der Technischen Universität Braunschweig

Herausgegeben von Christoph Wittmann

Band 45

Inhalt: Ziel der Arbeit war die Charakterisierung des intrapartikulären Proteintransports in der Hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) unter Variation charakteristischer Prozessbedingungen. Hierfür wurde ein teilweise automatisiertes, miniaturisiertes Screening-System mit einer zusätzlich auf Konfokaler Laser Raster Mikroskopie (CLSM) basierten Analysemethode für die Festphase etabliert. Die Klassifizierung der chromatographischen Systeme hinsichtlich optimaler Adsorptionsbedingungen erfolgte hinreichend basierend auf der indirekten Flüssigphasenanalyse. Der durch die direkte Analyse mit CLSM gemessene, intrapartikuläre Proteintransport konnte für qualifizierte Systeme mit einem Einzelpartikelmodell beschrieben werden, wodurch ein charakteristischer Parameter über die Packungsdichte der Proteine in verschiedenen Regionen der Adsorbenspartikel für jedes dieser Systeme erhalten wurde. Die CLSM Analyse liefert somit einen Prozessparameter mit potentiell direktem Bezug zu Proteineigenschaften und deren Veränderungen während des chromatographischen Trennvorgangs.

Suchbegriffe: Konfokale Laser Raster Mikroskopie, Hydrophobe Interaktions Chromatographie, Automatisiertes Chromatographie Parameter Screening

Content: The objective of this work was to characterize the inner particle protein transport in Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC) in response to varying process conditions. For experimental data aquisition a partly automated miniaturized screening system was established. In addition, confocal laser scanning microscopy (CLSM) was established for direct solid phase analysis. In terms of optimal adsorption conditions the chromatographic systems could be classified sufficiently based on indirect fluid phase analysis. The inner particle protein transport measured through CLSM could be described with a single particle model for qualified systems. For these systems a characteristic parameter describing the packing density within the different regions of the particle could be obtained. Thus, CLSM analysis provides additional information in terms of a process parameter which potentially links protein properties and their changes during the chromatographic separation step to process conditions.

Keywords: Confocal Laser Scanning Microscopy, Hydrophobic Interaction Chromatography, Automated Chromatography Parameter Screening

Transport von Proteinen in Partikeln der Hydrophoben Interaktions Chromatographie

Von der Fakultät für Maschinenbau
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung der Würde
eines Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)
genehmigte

Dissertation

von Dipl.-Biotechnol. Tim Herrmann
aus Heilbronn

FIT Verlag
Für Innovation und Technologietransfer
Paderborn 2010

Die vorliegende Arbeit wurde am Forschungszentrum Jülich, Institut für Biotechnologie 2, als Dissertation angefertigt.

Eingereicht am: 27.06.2009

Mündliche Prüfung am: 10.12.2009

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Dietmar C. Hempel

1. Referent: Prof. Dr. Christoph Wittmann

2. Referent: Prof. Dr. Christian Wandrey

Hinweis: Obgleich alle möglichen Anstrengungen unternommen wurden, um richtige und aktuelle Angaben in diesem Werk zum Ausdruck zu bringen, übernehmen weder der Herausgeber und der Autor noch sonstige an der Bearbeitung beteiligte Mitarbeiter eine Verantwortung für etwaige Ungenauigkeiten oder deren Folgen. Eventuelle Berichtigungen können erst in der nächsten Auflage berücksichtigt werden.

© **FIT**-Verlag für Innovation und Technologietransfer – Paderborn 2010

Alle Rechte, auch der Übersetzung, vorbehalten.

Dieses Werk – oder Teile daraus – darf nicht vervielfältigt werden, in Datenbanken gespeichert oder in irgendeiner Form – elektronisch, fotomechanisch, auf Tonträger oder sonst wie – übertragen werden ohne die schriftliche Genehmigung des Verlages.

Bibliografische Information

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISSN 1431-7230

ISBN 978-3-932252-51-8

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biotechnologie 2 des Forschungszentrums Jülich im Rahmen des Forschungsvorhabens „*Untersuchung von partikelseitigen Stofftransportphänomenen bei der Proteinadsorption mittels konfokaler Laser Raster-Rastermikroskopie (CSLM)*“ (DFG-Gz: KU 188/9-5). Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Bereitstellung der finanziellen Mittel. Desweiteren möchte ich einer Reihe von Leuten danken, die zu dem Gelingen der Arbeit beigetragen haben:

Ich danke Herrn Prof. Dr. Jürgen Hubbuch für die Möglichkeit, die Dissertation in seiner Arbeitsgruppe – zu dieser Zeit in Jülich – durchzuführen sowie für die große Unterstützung und exzellente Betreuung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Christian Wandrey danke ich für Chance, in seinem Institut zu arbeiten, die teilweise Finanzierung der Promotionsarbeit, die exzellenten Rahmenbedingung und sehr hilfreichen Diskussionen sowie Ratschläge während der Promotionsarbeit. Zudem danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Christoph Wittmann danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens für die Fakultät für Maschinenbau an der Technischen Universität Braunschweig sowie für die große Gastfreundschaft an seinem Institut für Bioverfahrenstechnik.

Herrn Prof. Dr.-Ing. Dietmar C. Hempel danke ich für die Übernahme des Vorsitzes der Promotionskommission an der Fakultät für Maschinenbau der Technischen Universität Braunschweig und die exzellente Koordinierung des Promotionsverfahrens.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Maria-Regina Kula für die großteilige Finanzierung dieser Promotionsarbeit über die DFG sowie für die sehr hilfreichen Diskussionen und Ratschläge während des Projektes.

Ich danke Herrn Dr.-Ing. Arthur Susanto für die Einführung in die Modellierung sowie für sehr hilfreiche Diskussionen.

Herrn Dr. Eric von Lieres gilt mein Dank für seine Unterstützung bei der Validierung der Adsorbensaliquotierung.

Frau Dipl.-Ing. Sina Pezold gilt mein Dank für ihre große Unterstützung im Labor während der Durchführung ihrer Diplomarbeit.

Ein besonderer Dank gilt der Werkstatt des FZ Jülich / IBT für die Spezialanfertigungen der Aliquotierungsmodule für die Adsorbentien sowie der Miniatursäulen.

Prof. Dr. Todd Przybycien danke ich für die Einführung in die Raman Spektroskopie im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes an der Carnegie Mellon University in Pittsburgh, USA.

Schließlich gilt mein Dank der gesamten Aufarbeitungsgruppe für die immer freundliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Eva und Michael Herrmann, meiner Frau, Dr. Ulrike Sorger-Herrmann, und meinem Sohn, Jannis Herrmann, für die stete Unterstützung in allen nur erdenkbaren Bereichen.

Richmond, im Juni 2009

Tim Herrmann

Veröffentlichungen

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Maschinenbau, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

- Herrmann, T., Schröder, M., Hubbuch, J. (2006). Generation of Equally Sized Particle Plaques Using Solid Liquid Suspensions. *Biotechnology Progress* 22, 914-918.
- Susanto, A., Herrmann, T., Hubbuch, J. (2006). Short-cut method for the correction of light attenuation influences in the experimental data obtained from confocal laser scanning microscopy. *Journal of Chromatography A* 1136, 29-38.
- Susanto, A., Herrmann, T., Hubbuch, J. (2007). Investigation of pore diffusion hindrance of monoclonal antibody in hydrophobic interaction chromatography using confocal laser scanning microscopy. *Journal of Chromatography A* 1149, 178-188.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Proteinchromatographie und anschließende Analysemethoden in der pharmazeutischen Biotechnologie	1
1.1.1	Die Hydrophobe Wechselwirkungschromatographie als Trennprinzip in der Proteinchromatographie	1
1.1.2	Analysemethoden in der Proteinchromatographie	2
1.1.3	Konfokale Laser Raster Mikroskopie als Analysemethode	3
1.1.4	Das Konzept des ‚Design Space‘ und der ‚Quality by Design‘ (QbD)-Zulassung von Biopharmazeutika	3
1.2	Zielsetzung und Aufgabenstellung	6
2	Theoretische Grundlagen	8
2.1	Grundlagen der Proteinchromatographie	8
2.1.1	Definition	8
2.1.2	Betriebsweisen	8
2.1.3	Trennprinzipien	12
2.1.4	Adsorption	13
2.1.5	Stofftransport in Flüssigphasen	17
2.2	Erstellung des Bilanzmodells für einen Einzelpartikel	20
2.2.1	Definition des effektiven Porendiffusionskoeffizienten	21
2.2.2	Erweiterung des effektiven Porendiffusionskoeffizienten	24
2.2.3	Differentielle Massenbilanzen	25
2.3	Eigenschaften wässriger Lösungen	27
2.3.1	Lösungseigenschaften von Wasser	28
2.3.2	Hydrophobizität von Proteinen	31

Inhaltsverzeichnis

2.3.3	Eigenschaften biochemischer Puffer	31
2.4	Optische Eigenschaften von Molekülen und deren Detektion	33
2.4.1	Lichtextinktion	33
2.4.2	Fluoreszenz	35
2.4.3	Konfokale Laser Raster Mikroskopie (CLSM)	37
3	Material und Methoden	44
3.1	Materialien	44
3.1.1	Proteine	44
3.1.2	Fluorophore	45
3.1.3	Adsorbentien	48
3.1.4	Puffersysteme	48
3.2	Experimentelle Methode	50
3.2.1	Probenvorbereitung	50
3.2.2	Experimente im Säulenmodus	54
3.2.3	Experimente im Shallow Bed Modus	59
3.2.4	Experimente im Finite Bath Modus	61
3.3	Erstellung intrapartikulärer Konzentrationsprofile	74
3.3.1	Radiale Mittelung des gemessenen Fluoreszenzsignals	75
3.3.2	Korrektur der Lichtabschwächung	76
3.3.3	Erstellung absoluter intrapartikulärer Konzentrationsprofile	78
4	Ergebnisse	80
4.1	Löslichkeiten der Proteine in verschiedenen HIC Puffersystemen	80
4.2	Einfluss der Proteinmarkierung mit Fluorophoren auf das Adsorptionsverhalten	81
4.2.1	Dynamische Sorptionsstudien im Säulenmodus mit indirekter Analyse	82

Inhaltsverzeichnis

4.2.2	Sorptionsstudien im Shallow Bed Modus mittels direkter und indirekter Analyse	88
4.2.3	Sorptionsstudien im Finite Bath Modus mittels direkter und indirekter Analyse	92
4.3	Simulation der intrapartikulären Proteinkonzentration	97
4.3.1	Einfache Porendiffusionsbehinderung	97
4.3.2	Erweiterte Porendiffusionsbehinderung	101
4.4	Einfluss chromatographischer Prozessparameter auf die Adsorptionseigenschaften der untersuchten HIC-Systeme.	105
4.4.1	Kosmotrope Salze: Position in der Hofmeister-Reihe und Konzentrationseffekte von NaCl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	106
4.4.2	Ligandendichte: Phenyl-Liganden auf Sepharose 6 FF Partikeln	116
4.4.3	Proteinhydrophobizität & -größe: Charakterisierung anhand verschiedener Kennzahlen	119
5	Diskussion und Ausblick	123
5.1	Limitierungen der CLSM Analyse im Finite Bath Modus	124
5.1.1	Optische Messartefakte bei der Messung der Fluoreszenzintensität mit der CLSM	126
5.1.2	Kompetitives Adsorptionsverhalten von markierten und unmarkierten Proteinen	130
5.1.3	Fazit für die untersuchten HIC Systeme	133
5.1.4	Aliquotierung der Adsorbenspartikel für die Finite Bath Messungen	136
5.1.5	Normierung der Radien der direkt analysierten Partikel	141
5.2	Aussagekraft der CLSM für die Charakterisierung von HIC-Systemen	146

Inhaltsverzeichnis

5.2.1	Wertigkeit der CLSM Daten und des Erweiterten Porendiffusionsmodells für die Charakterisierung von HIC Systemen	146
5.2.2	Experimenteller Nachweis von Strukturänderungen bei der Adsorption von Proteinen	152
5.3	Ausblick	156
5.3.1	Charakterisierung der strukturellen Eigenschaften der Protein-Adsorptiva	156
5.3.2	Weiterführende Charakterisierung der unterschiedlichen Ergebniskategorien eines formal gleichen chromatographischen Systems	159
6	Anhang	161
6.1	Parameter aus den Isothermen- und Kinetikmessungen	161
6.2	Verzeichnisse verwendeter Materialien	164
6.2.1	Herstellerverzeichnis	164
6.2.2	Geräteverzeichnis	164
6.2.3	Chemikalienverzeichnis	166
7	Literaturverzeichnis	172

1 Einleitung

1.1 Proteinchromatographie und anschließende Analysemethoden in der pharmazeutischen Biotechnologie

Im Bereich der biotechnologischen Industrie spielt die pharmazeutische Biotechnologie bezogen auf die Wertschöpfung die bedeutendste Rolle. Die in diesem Industriezweig produzierten Biopharmazeutika, überwiegend Proteine und deren Derivate, erzielten im Jahr 2005 einen Verkaufserlös von mehr als 30 Milliarden US-\$. Neben den weniger als 100 zugelassenen Produkten befanden sich über 500 in den klinischen Studien [Walsh 2005]. Unter den Proteinen nahmen die monoklonalen Antikörper den größten Anteil ein.

Bedingt durch die extrem hohen Qualitätsanforderungen an diese Pharmazeutika, insbesondere im Bezug auf ihre Reinheit, spielt die Aufreinigung, bzw. Aufarbeitung, eine der wichtigsten Rollen im Produktionsprozess. Innerhalb der Aufreinigungsmethoden nimmt die Proteinchromatographie die zentrale Rolle ein, wobei es sich bei ausnahmslos jedem Aufreinigungsprozess um eine Kombination, bzw. Hintereinanderschaltung von Chromatographiesäulen zu einer Kaskade handelt. Diese Kaskade besteht mindestens aus zwei Säulen unter Verwendung verschiedener Trennprinzipien, wobei eine Anzahl von drei bis fünf Säulen üblich ist.

1.1.1 Die Hydrophobe Wechselwirkungschromatographie als Trennprinzip in der Proteinchromatographie

Der Hydrophoben Wechselwirkungschromatographie (engl. Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC) kommt innerhalb einer Säulen-kaskade als einfach einsetzbarer und wirkungsvoller Sekundär- oder Tertiärschritt eine sehr wichtige Rolle zu. Durch die Entwicklung einer ganzen Bandbreite von Affinitätsliganden auf Antikörper(-fragment)basis, Peptidbasis oder synthetischer

1 Einleitung

Basis (z.B. [Roque et al. 2004]) wird fast ausnahmslos jedes pharmazeutische Protein mit einem Affinitätschromatographieschritt (engl. Affinity Chromatography, AC) als Primär- oder Sekundärschritt in der Säulenkaskade aufgereinigt. Die HIC erlangt ihre große strategische Bedeutung dadurch, dass sie als Folgeschritt sehr gut geeignet ist. Die produktschonenden Elutionsbedingungen, besonders für nicht Antikörper-basierte Produkte, von einer AC Säule umfassen zumeist eine hohe Salzkonzentration, die generell für die Beladung einer HIC-Säule benötigt wird. Dies schlägt sich auch in Patenten nieder, welche i.d.R. den Produktionsprozess eines pharmazeutischen Proteins bei seiner Zulassung patentrechtlich schützen. So wurde z.B. der generelle Einsatz eines HIC Schrittes für die Aufreinigung des betrachteten pharmazeutischen Proteins als Folgeschritt nach einer AC patentiert, vgl. *Smeds et. al.* [Smeds 1999].

1.1.2 Analysemethoden in der Proteinchromatographie

Für die Bewertung, bzw. die Analyse der Reinheit und der physiologischen Intaktheit der Pharmazeutika für die Prozessentwicklung wird ein ganzes Spektrum an physikalischen und biochemischen Analysemethoden eingesetzt. Diese unterscheiden sich durch die Messgröße sowie die benötigte Analysezeit. Die für das Produkt spezifischsten Methoden sind biochemischer Natur und liefern Aussagen über Produktmenge und (spezifische) Aktivität, benötigen allerdings für die vollständige Analyse eines Säulenlaufs in der Praxis Analysezeiten von mehr als 24 h.

Als weniger produktspezifische Analysemethoden, bei denen das Messergebnis allerdings dafür praktisch in Echtzeit erhalten wird, kommen zwei optische Methoden in Frage. Die Absorption von monochromatischem Licht erfolgt bei Proteinen und Polypeptiden bei charakteristischen Wellenlängen ebenso wie die Fluoreszenz (vgl. Kapitel 2.4.1 und 2.4.2). Diese beiden optischen Messmethoden kommen sowohl als Echtzeit-Messverfahren mit einem Detektor direkt am Ausgang der Produktionssäulen zum Einsatz als auch bei separat erfolgenden chromatographischen Analysemethoden. Bei den letztgenannten ergeben sich reale Prozessierungszeiten zwischen 2 h und 24 h für die Charakterisierung eines Aufreinigungsansatzes.

1.1 Proteinchromatographie und Analysemethoden

Die zuvor genannten Analysemethoden lassen sich als indirekte Analysemethoden klassifizieren, da die Trennleistung der Chromatographiesäule aus den Daten der Flüssigphasenanalyse gewonnen wird. Wichtige Größen, wie z.B. die zeit- und ortsabhängige Beladung der Säule sowie deren maximale Kapazität werden indirekt aus den Daten der Flüssigphase gewonnen.

1.1.3 Konfokale Laser Raster Mikroskopie als Analysemethode

Ergänzend zu den zuvor beschriebenen indirekten Analysemethoden eröffnet die Konfokale Laser Raster Mikroskopie (engl. Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) die Möglichkeit, den Beladungsverlauf im Inneren von Referenzpartikeln des Trennmateri als direkt zu messen. Das Fluoreszenzsignal aus der Partikelebene liefert dabei relative Fluoreszenzintensitätswerte, welche mittels der Massenbilanzen aus der Flüssigphasenanalyse in absolute Werte für die Beladungsverteilung innerhalb der Adsorbentien umgerechnet werden können.

Bei dem verwendeten 1-Photonenmikroskop ist für den Erhalt eines auswertbaren Fluoreszenzsignals die Markierung einer Minderheit der analysierten Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen, auch Fluorophore genannt, notwendig. Die Fluoreszenzmessung im Inneren des Trennmateri als unterliegt dem experimentellen System immanenten Lichtabschwächungseffekten, die bedingt durch den Aufbau des 1-Photonenmikroskops unter Anwendung von trigonometrischen Funktionen quantifiziert werden können (vgl. Kapitel 3.3.2). Diese Daten können für die Signalkorrektur verwendet werden. Weitere Angaben zu Hintergrund und Funktionsweise der CLSM finden sich in Kapitel 2.4.3.

1.1.4 Das Konzept des ‚Design Space‘ und der ‚Quality by Design‘ (QbD)-Zulassung von Biopharmazeutika

Neben den traditionell gewünschten detaillierten Kenntnissen über das physiologische Wirkungsspektrum des neu zu zulassenden Pharmazeutikums werden von den Zulassungsbehörden zunehmend detailliertere Kenntnisse über den so genannten ‚Design Space‘ gefordert. Dieser Begriff wird in den international harmonisierten Richtlinien für pharmazeutische Prozessentwicklung

1 Einleitung

(ICH, International Conference on Harmonisation) definiert: Es ist der Prozessparameterraum, in dem der funktionale Zusammenhang zwischen den hinreichenden und notwendigen Prozessparametern und den kritischen Qualitätseigenschaften des Pharmazeutikums lückenlos definiert sein muss (ICH Q8, [Moheb Nasr 2008]). Im Vergleich zu den traditionellen Vorgaben, in dem das Prozessverhalten und damit die Produktqualität um die identifizierten Optima plusminus eines Sicherheitsfaktors definiert sein muss, erhöhen sich die Anforderungen bezüglich der Anzahl der benötigten Experimente, der Auswertung eines wesentlich größeren Datenvolumens, sowie der modellbasierten Beschreibung des Prozesses. Typische Prozessparameter in diesem Spektrum sind physikalisch-chemische Eigenschaften der Laufmittel, der Trennmaterialien sowie des zu trennenden Materials, auch in Abhängigkeit von ihrem jeweiligen Alter.

Neben den zuvor beschriebenen höheren Anforderungen für die Entwicklung des eigentlichen Prozesses ergeben sich noch weitere Forderungen von Seiten der Zulassungsbehörden bezüglich einer verbesserten Prozesskontrolle des eigentlichen Produktionsprozesses (ICH Q9, [Joneckis 2006]). Diese Kontrollmethoden müssen ebenfalls während der Prozessentwicklungsphase mitentwickelt werden.

Beide Anforderungsfelder bieten den Entwicklungsabteilungen die Möglichkeit, mit diesen detaillierteren Prozesskenntnissen die Einhaltung der Qualitätsanforderungen an das Produkt bei Prozessänderungen innerhalb dieses Parameterraumes zu garantieren. Damit entfällt auch die Notwendigkeit, den Qualitätsstandard bei Prozessänderungen in klinischen Studien erneut bestätigen zu müssen. Eine solche ‚Quality by Design (QbD)‘ Zulassung ist erstrebenswert, da aufgrund des hohen Entwicklungstempos und des hohen ökonomischen Risikos eines prä-klinischen Produktes oft großes Verbesserungspotential in den neu entwickelten Prozessen steckt.

Die Erfassung des ‚Design Space‘ eines proteinchromatographischen Trennungsschrittes wird durch die Anwendung statistischer Modelle zur experimentellen Planung und Datenauswertung gestützt. Soweit möglich komplementieren und erweitern Mechanistische Modelle oder Bilanzmodelle die Beschreibung der Trennprozesse. Durch die Anwendung automatisierter Hochdurchsatztechniken wird die Anzahl an untersuchbaren Parametern innerhalb eines vorgegebenen Zeitrahmens erhöht.

1.1 Proteinchromatographie und Analysemethoden

Automatisierte Hochdurchsatztechniken in der proteinchromatographischen Prozessentwicklung

Relevante Prozessparameter in der Proteinchromatographie, wie statische und dynamische Verteilungskoeffizienten des Produktes und dessen Verunreinigungen zwischen mobiler und stationärer Phase sowie maximale Kapazitäten der letztgenannten, können anstatt in Säulen auch in anderen experimentellen Systemen bestimmt werden. Als Betriebsweisen kommen hier sowohl der Finite Bath Modus als auch der Shallow Bed Modus in Frage, die in Kapitel 2.1.2 dargestellt sind.

Bedingt durch den hohen Arbeitsaufwand waren diese Messweisen bis dato lediglich auf den akademischen Bereich beschränkt, finden aber aufgrund der mittlerweile einfachen Verfügbarkeit von Laborrobotern zunehmend in miniaturisierter und automatisierter Form in der industriellen Prozessentwicklung Verwendung [Bensch et al. 2005; Staby et al. 2007].

Mathematische Modelle zur Unterstützung der Prozessentwicklung

Für die chromatographische Prozessentwicklung werden mathematische Modelle für zwei Aufgabenfelder verwendet:

Statistische Modelle werden zur experimentellen Planung (engl. Design of Experiment, DoE) und Datenauswertung eingesetzt. Hierbei ist ein detailliertes mechanistisches Verständnis der untersuchten Vorgänge nicht notwendig, da die vorgegebenen Faktoren einzig anhand ihres Typs auf rein statistischer Basis untersucht werden. Zwei Typen von Faktoren, kategorische oder kontinuierliche, können auftreten. Im ersten Fall haben sie fest definierte, oftmals qualitative Eigenschaften, im zweiten Fall sind es numerische Werte innerhalb vorgegebener Grenzen. Diese Faktoren und deren Produkte werden durch iterative Variation bezüglich einer Zielfunktion optimiert. So können diese Modelle z.B. für die Optimierung eines Assays zur Analyse von chromatographischen Trennschritten oder als Testmethode für die Robustheit eines chromatographischen Trennschrittes eingesetzt werden. Im letzteren Fall wird auch oft das Maß der Beeinflussbarkeit von bereits optimierten Parametern durch bestimmte Prozessparameter untersucht (engl. Surface Response Mapping, SRM).

1 Einleitung

Im Gegensatz dazu bilden Chromatographiemodelle den eigentlichen Trennprozess ab. Ein Überblick über die verschiedenen Modelle ist bei *Susanto et. al.* zu finden [Susanto 2006].

Mechanistische Retentionsmodelle simulieren den in der Chromatographie gebräuchlichen Retentionsfaktor, der in (53) dargestellt ist. Im linearen Chromatographiebereich, d.h. bei sehr kleinen Konzentrationen des Adsorptivs und bei Vernachlässigung der Adsorptionskinetik lässt sich der Retentionsfaktor durch die Anfangssteigung der Isothermen ausdrücken. Durch diese direkte Ableitung aus den Isothermen beruhen diese Modelle auf den rein thermodynamischen Grundlagen der Phasenverteilung zwischen mobiler und stationärer Phase und sind somit für eine relativ große Anzahl von Proteinen gültig. Aufgrund der notwendigen Linearität beschränken sich diese Modelle allerdings auf analytische Trennprozesse.

Im Gegensatz zu den Retentionsmodellen bilden Bilanzmodelle die Chromatographieranlage basierend auf differentiellen Massenbilanzen ab. Sie können somit je nach Modelltiefe die Fluidodynamik der Anlage, den Stofftransport an der Phasengrenzfläche und im Partikelinneren, sowie die zeitabhängige Einstellung des Adsorptionsgleichgewichts abbilden. Mit den daraus abgeleiteten Größen lassen sich wesentliche Parameter eines chromatographischen Trennschritts, wie dynamische Kapazität, Selektivität und Ausbeute simulieren. Prinzipiell können für diese Modelle physikalische Korrelationen verwendet werden, oft werden aufgrund fehlender Verfügbarkeit allerdings empirische Korrelationen verwendet. Dies ist auch bei dem Einzelpartikelmodell von *Susanto et. al.* der Fall, das in dieser Arbeit verwendet wurde und in Kapitel 2.2 dargestellt ist.

1.2 Zielsetzung und Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Anwendbarkeit der CLSM als Analysetechnik für HIC Systeme zu evaluieren und adäquate experimentelle Methoden für die Analyse und Klassifizierung von HIC Systemen zu etablieren und zu optimieren.

1.2 Zielsetzung und Aufgabenstellung

Desweiteren sollten der Nutzen und die Aussagekraft der zusätzlich erhaltenen Informationen aus der CLSM Analyse für die Entwicklung eines HIC Schrittes als Trennstufe eines Aufreinigungsprozesses abgewägt werden.

Für die Etablierung der CLSM als Analysetechnik für HIC Systeme standen folgende Fragestellungen im Vordergrund:

Die HIC ist durch die Verwendung von hohen Salzkonzentrationen in der Flüssigphase ein schwerer beherrschbares System als z.B. die Ionenaustauschchromatographie (engl. Ion Exchange Chromatography, IEC), die bereits Gegenstand von umfangreichen Studien mit der CLSM war. Bedingt durch die hohen Salzkonzentrationen kommt es bei der HIC sehr häufig zu Produktverlusten bedingt durch unterschiedliche Phänomene, wie Proteinagglomeration, unspezifische Adsorption abseits der Adsorbentien sowie Präzipitation auf den Adsorbentien. Die vorhandenen experimentellen Methoden wurden bezüglich ihrer Anwendbarkeit auf diese komplexen HIC Systeme hin untersucht.

Bei der Benutzung eines 1-Photonen-CLSM ist die Markierung der zu untersuchenden Proteine mit Fluorophoren notwendig. Bei der IEC sind Effekte der Markierung in Abhängigkeit von der Art und Größe des Proteins, der Nettoladung des Fluorophors sowie der Position der Markierung innerhalb der Peptidsequenz eines Proteins untersucht worden. Diese Effekte sind zum Teil sehr stark ausgeprägt. Der Effekt der Markierung auf die hier untersuchten Proteine in der HIC musste in dieser Fragestellung adressiert werden.

Für die Beurteilung der Aussagekraft der CLSM-Analyse bei der Klassifizierung von chromatographischen Systemen stand folgende Fragestellung im Vordergrund:

Durch die Kombination von hohen Salzkonzentrationen und hydrophoben Adsorbentien in der HIC kann es zu einer potentiellen Veränderung der Proteinstruktur bei der Adsorption kommen. Mit der Anwendung eines Einzelpartikelmodells zur Simulation der Adsorptionsvorgänge im Partikelinneren sollte untersucht werden, ob Behinderungen des Massentransports durch adsorbierte Proteine in Abhängigkeit von zwei strukturellen Zuständen plausibel erscheinen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Grundlagen der Proteinchromatographie

2.1.1 Definition

Die Chromatographie ist ein thermisches Trennverfahren, bei dem die zu trennenden Stoffe in einer mobilen gasförmigen oder flüssigen Phase durch eine stationäre Phase befördert werden. Die Stofftrennung erfolgt durch unterschiedlich stark ausgeprägte Verteilung der verschiedenen Stoffe zwischen den Phasen [Nic 2006]. In der Proteinchromatographie ist das zu trennende Proteingemisch in einem wässrigen Puffersystem gelöst. Die stationäre Phase, oft auch Festphase genannt, besteht in der industriellen Anwendung im häufigsten Fall aus porösen Partikeln [Flickinger 1999].

2.1.2 Betriebsweisen

Es existieren unterschiedliche Betriebsweisen um das in wässriger Lösung befindliche Ausgangsmaterial mit der stationären Phase in Kontakt zu bringen.

Wie schon an der grundlegenden Definition der Chromatographie ersichtlich, findet die Durchströmung eines gepackten Betts, der Säulenmodus, die häufigste Anwendung. In dieser Arbeit fanden zwei weitere Betriebsweisen ebenfalls Verwendung, der Homogene Suspensionsmodus (engl.: Finite Bath Mode) und der Miniatursäulen-Betriebsmodus (engl.: Shallow Bed Mode). Alle drei Betriebsweisen, Säulenmodus, Finite Bath Modus und Shallow Bed Modus sind in **Bild 2.1** skizziert.

2.1 Grundlagen der Proteinchromatographie

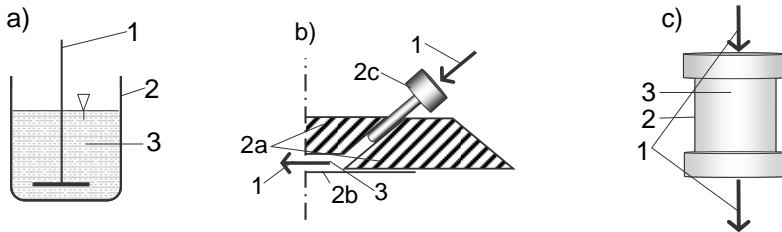


Bild 2.1: Schematische Darstellung der häufigsten Betriebsweisen in der Proteinchromatographie. Im Homogenen Suspensionsmodus (a) (engl.: Finite Bath Mode) wird die Festphase (a3) mittels eines Mischwerkzeugs (a1) homogen in der Flüssigphase (a3) suspendiert. Das ganze System befindet sich in einem geschlossenen Behälter (a2), die Proteinkonzentration in der Flüssigphase wird als örtlich konstant angenommen. Im Säulenmodus (c) ist die Festphase (c3) in einem zylinderförmigen Behälter (c2) gepackt, die von der Flüssigphase (c1) durchströmt wird. Der Miniatursäulenbettmodus (b) nutzt ebenfalls ein gepacktes Bett bestehend aus der Festphase (b3), welches sich in einem geometrisch komplexeren Behälter (b2a-b2c) befindet, der den analytischen Gegebenheiten, z.B. einem Mikroskoptisch, angepasst ist. Das Bett wird ebenfalls von der Flüssigphase (b1) durchströmt.

Säulenmodus

Proteinchromatographische Trennprozesse im präparativen Maßstab laufen unter niedrigen linearen Fließgeschwindigkeiten von $240 - 400 \text{ cm h}^{-1}$ mit Reynolds-Zahlen im laminaren Bereich ab (Sheehan 1996; Janson 1997). Hier können sowohl kompressible als auch inkompressible Festphasen auf Kunststoff oder Silica Basis Verwendung finden. Das Strömungsprofil in einer solchen Niederdruck-Säule wurde mittels Magnetic Resonance Imaging visualisiert [Holland et al. 2004].

Proteintrennungen unter höheren linearen Fließgeschwindigkeiten mit höherem Druckabfall, also unter Bedingungen einer so genannten „High Performance Liquid Chromatography (HPLC)“, benötigen rigide, inkompressible Festphasen und finden weniger in der Produktion als in der Analytik Anwendung (Wisniewski 1992; Nageswara Rao et al. 2003).

Die größten Einflussfaktoren auf das Strömungsverhalten in Säulen sind physikalische Parameter wie Lösungsmittelviskosität und Temperatur sowie

2 Theoretische Grundlagen

geometrische Eigenschaften des gepackten Betts. Dazu zählen Packungsdichte der Partikel, Frittengeometrie, Partikelgröße sowie der Säulendurchmesser und das Verhältnis der beiden [Suzuki et al. 1972; Shalliker et al. 1998; Shalliker et al. 1999; Guiochon et al. 2003].

Finite Bath Modus

Beim Finite Bath Modus wird die Festphase durch ein Mischwerkzeug, i. d. R. ein Rührer oder ein horizontaler Orbitalschüttler, homogen in der Flüssigphase suspendiert. Bei idealer Durchmischung entfällt damit der konvektive Stofftransport in der experimentellen Betrachtung und es wird lediglich die Phasenverteilung des Adsorptivs analysiert und damit bei Einstellung eines Verteilungsgleichgewichtes die Trennleistung eines Theoretischen Bodens approximiert (vgl. Kapitel 2.1.1). Durch Messung von Adsorptionskinetiken und reine Flüssigphasenanalyse können effektive Porendiffusionskoeffizienten ermittelt werden.

Einen Überblick über Modellierungsansätze zur Bestimmung der Porendiffusionskoeffizienten sowie über die möglichen Versuchsaufbauten gibt *Carta et. al.* [Carta et al. 2005]. Komplexere Systeme im Milliliter-Labormaßstab verwenden zudem eine kontinuierlich betriebene Probenschleife für die Quasi-Online-Flüssigphasenanalyse; bei Bedarf mit vorgeschalteter analytischer Trennsäule vor dem Detektor [Anspach et al. 1996; Weaver et al. 1996; Hunter et al. 2000; J. A. Wesselingh 2001]. Bei miniaturisierten Systemen im Mikrolitermaßstab, wie sie auf Laborrobotern eingesetzt werden, finden einfache Reaktionsgefäße auf einem Orbitalschüttler Verwendung.

Finite Bath Experimente werden selten für die eigentliche präparative Trennung eingesetzt, Ausnahmen finden sich in der Lebensmittelindustrie, z.B. bei Molkereiprodukten [Scopes 1994]. Vielmehr dienen sie für eine erste Charakterisierung des chromatographischen Systems, d.h. für die Auswahl geeigneter stationärer Phasen und Prozessparameter für die Optimierung der Trennleistung. Für die Charakterisierung der Adsorptionskinetik eines HIC Systems wurde der Finite Bath Modus bereits erfolgreich eingesetzt [Conder et al. 2000; Tscheliessnig et al. 2005].

2.1 Grundlagen der Proteinchromatographie

Shallow Bed Modus

Eine Zwischenform zwischen dem Rührkessel- und Säulenmodus stellt der Miniatursäulen-Betriebsmodus (engl. Shallow Bed) dar, bei dem ebenfalls ein gepacktes Bett verwendet wird, dessen Volumen im ein- bis dreistelligen Mikroliterbereich liegt und damit i.d.R. unterhalb der Untergrenze für reguläre Niederdruckchromatographie von Proteinen rangiert.

In seiner klassischen Anwendung werden die funktionalisierten Adsorbentien in der Mitte mit einem Überschuss an undervatisierten Adsorbentien, d.h. Partikeln ohne funktionale Liganden, ummantelt und in eine reguläre Chromatographiesäule gepackt [Carta et al. 2005]. Bedingt durch das geringe Adsorbensvolumen und eine entsprechend hoch einstellbare Fließgeschwindigkeit kann die Flüssigphasenkonzentration an jeder Position entlang der Säulenachse als nahezu konstant angesehen werden, d.h. der ‚Durchbruch‘ der Proteinlösung durch das Adsorbensbett erfolgt unmittelbar. Nach einem Waschschrift wird das gebundene Protein eluiert und die Elutionsbande für die Bestimmung der Adsorbenskapazität integriert. Der Unterschied zum Finite Bath Modus besteht darin, dass die Shallow Bed Experimente in einer hydrodynamischen Umgebung wie bei einem regulären chromatographischen Säulenlauf stattfinden und die Proteine für die Kapazitätsbestimmung vollständig eluierbar sein müssen [Carta et al. 2005; Tscheliessnig et al. 2005].

Wird stattdessen ausschließlich funktionalisiertes Adsorbensmaterial in eine entsprechend kleine Kartusche gepackt, so ergeben sich zu dem regulären Anschluss an eine Chromatographieranlage Alternativen. So kann die Durchströmung des gepackten Betts auch durch den Kolbenhub einer Pipette oder die Spritzenpumpe eines Pipettierroboters [Britsch L. 2007] bewirkt werden. Alternativ kann der Transport der Flüssigphase auch durch ein Schwere- [Leonard et al. 1985], Zentrifugal- [Kökpınar et al. 2006], oder Vakuumfeld [Rege 2006] angetrieben werden. Wird das optische Messsignal direkt von der Festphase online aufgenommen, so werden weitere Modifikationen nötig, um das Design des Packungsbehälters an die optische Messvorrichtung anzupassen. Die häufigste Anwendung ist hierbei die Konfokale Laser Raster Mikroskopie, bei der Packungsbehälter an den Probentisch des Mikroskops angepasst werden müssen [Lewus et al. 1999; Hubbuch et al. 2002].

2 Theoretische Grundlagen

Die Übergänge zu einer realen Säule sind allerdings gerade bei den im vorigen Abschnitt vorgestellten Säulenmodifikationen fließend. Bei Volumina im dreistelligen Mikroliterbereich und bei Einhaltung bestimmter säulentypischer Höhe zu Durchmesser Verhältnisse von 5 - 10 kann das Trennverhalten einer regulären Säule unter Berücksichtigung des wesentlich größeren Einflusses des Wandeffekts bei den Miniatursäulen in größten Teilen reproduziert werden. So wurde dies z.B. von *Wiendahl et. al.* mit verschiedenen Modellproteinen beim Vergleich einer 200 µl Säule mit entsprechendem Adapter für einen Pipettierroboter und einer regulären 1 ml, bzw. 2 ml Säule gezeigt [Wiendahl et al. 2008].

Dieser Modus wird aufgrund seines geringeren Materialverbrauchs oft für frühe Screening-Studien eingesetzt, in denen Betriebsparameter wie pH-Wert und Salzkonzentration der Laufpuffer für die nachfolgenden Säulenexperimente optimiert, bzw. auf einen sehr engen Bereich eingegrenzt werden.

2.1.3 Trennprinzipien

Neben der Betriebsweise ist die physikalische Eigenschaft der Proteine und stationären Phase, die für die Stofftrennung ausgenutzt wird, das entscheidende Merkmal für die Klassifizierung von Chromatographietechniken. Grundlegende Erläuterungen zu den häufigsten Trennprinzipien sind in jedem Lehrbuch zur Proteinchromatographie zu finden; z. B. [Scopes 1994; Janson 1997; Schmidt-Traub 2005]. In dieser Arbeit kamen drei Trennprinzipien zur Anwendung:

In der Größenausschlusschromatographie (engl.: Size Exclusion Chromatography, SEC) erfolgt die Trennung aufgrund unterschiedlicher Größe. Kleinere Proteine haben eine bessere Zugänglichkeit zu dem Porensystem der Säulenmatrix als größere, mit zunehmender Verdichtung des Netzwerks werden größere Proteine vom Zugang „ausgeschlossen“ und insgesamt weniger stark von der stationären Phase retardiert.

Bei der HIC werden durch Zugabe von hohen Mengen an Salzen, die eine stärkere Löslichkeit als die Proteine aufweisen, Wassermoleküle von der Hydrathülle der Proteine abgezogen. Die Anlagerung hydrophober Teile der Proteinoberfläche an die ebenfalls hydrophobe Oberfläche der Festphase ist nun thermodynamisch

2.1 Grundlagen der Proteinchromatographie

begünstigt. Eine Verringerung des Salzgehaltes führt im Idealfall zu einer vollständigen Aufhebung aller Proteinanlagerungen an die stationäre Phase.

Bei der Reverse Phase Chromatographie (englisch synonym, RPC) bindet die sehr viel stärker hydrophobe Oberfläche der stationären Phase bereits so viele Wassermoleküle, dass keine weitere Zugabe von Salzen mehr notwendig ist und die Proteinanlagerung bereits in Wasser erfolgt. Für die Aufhebung dieser Protein-Adsorbens-Interaktion ist der Einsatz von weniger polaren, organischen Lösungsmitteln erforderlich.

2.1.4 Adsorption

Begriffsdefinition

Der Begriff der Adsorption ist definiert als ein Vorgang, in dem sich Moleküle an einer (Phasen-)Grenzfläche anlagern. Für die Chromatographie besonders relevant ist hierbei die Anlagerung von Molekülen aus einer mobilen Flüssig- oder Gasphase an einer stationären Festphase. In dieser Arbeit wird die von *Kümmel et. al.* [Kümmel 1990] eingeführte Terminologie verwendet, in **Bild 2.2** dargestellt.

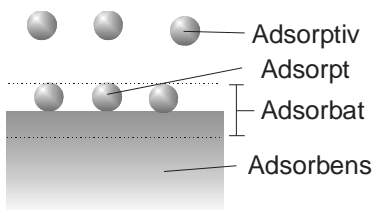


Bild 2.2: Schematische Darstellung der Begriffsdefinition zum Thema Adsorption. Die Abbildung ist modifiziert nach *Kümmel et. al.* [Kümmel 1990]. In der Flüssigphase werden die zu adsorbierenden Moleküle als Adsorptiv bezeichnet. Die auf der Adsorbensoberfläche adsorbierten Moleküle werden als Adsorbat bezeichnet.

Das adsorbierende Material ist als Adsorbens definiert; der Teil des Adsorbens, der an der Interaktion mit den Adsorptiva beteiligt ist, bildet zusammen mit diesen das Adsorbat.

Isothermengleichungen in der Proteinchromatographie

Die Verteilung der Protein-Adsorptiva zwischen Flüssigphase und Adsorbentien erreicht in einem betrachteten Bilanzraum nach einer systemspezifischen Inkubationsdauer ein Gleichgewicht, in dem sich die Proteinkonzentrationen in

2 Theoretische Grundlagen

beiden Phasen nicht mehr ändern. Diese Gleichgewichte sind besonders einfach in diskontinuierlichen Betriebsweisen, wie z.B. dem in Kapitel 2.1.2 beschriebenen Finite Bath Modus, zu bestimmen und werden durch Isothermengleichungen beschrieben. Diese Gleichungen stellen die Beladung der Adsorbentien als Funktion der Flüssigphasenkonzentration dar, die nach Einstellung dieses Gleichgewichts vorhanden ist. Die Isothermengleichung bildet das Fundament der mathematischen Beschreibung, da eventuelle Transportlimitierungen durch den eingestellten Gleichgewichtszustand eliminiert werden und unter idealen Bedingungen lediglich die Art der Wechselwirkung zwischen den Protein-Adsorptiva und der Adsorbensoberfläche betrachtet wird. Abweichungen von diesem Idealfall werden bei der Beschreibung des Modells nach *Langmuir* aufgelistet.

Die meisten Adsorptionsisothermen in der Proteinchromatographie haben zwei Bereiche:

Der ‚lineare Bereich‘ der Isotherme bildet mit der ‚Geradensteigung‘ innerhalb der Grenzwerte auf der Abszisse eine ‚Konstante‘ des chromatographischen Systems ab, die in anderen thermischen Trennverfahren als *Henry-Koeffizient* bezeichnet wird und ein Maß für die ‚Affinität‘ der Adsorbentien für das Adsorptiv unter den eingestellten physikalisch-chemischen Bedingungen ist. In diesem ‚linearen Bereich‘ wird die Affinität der Adsorbensoberfläche relativ unverfälscht dargestellt, da der geringen Konzentration an Adsorptiva ein Überschuss an vorhandenen Bindungsplätzen zur Verfügung steht.

Im ‚nicht-linearen Bereich‘ wird der Phasenübergang der Adsorptiva mit zunehmender Flüssigphasenkonzentration weniger effizient und der *Henry-Koeffizient* ist nicht mehr konstant, sondern nimmt mit zunehmender Adsorptivkonzentration in der Flüssigphase ab.

In Abhängigkeit von der Komplexität des betrachteten chromatographischen Systems, insbesondere der zugrunde liegenden Wechselwirkung als Trennprinzip, können Isothermengleichungen mehr oder weniger erfolgreich beide Bereiche der Isotherme beschreiben. Zudem bestimmt die theoretische Nähe des Modells zu den zugrunde liegenden Wechselwirkungen, in welchem Maß die Parameter der Gleichung reale, physikalisch-chemische Eigenschaften aufweisen.

Für den Fall der Ionenaustauschchromatographie existiert mit dem Steric Mass Action (SMA) Modell von *Brooks und Cramer* ein Modell, welches den gesamten

2.1 Grundlagen der Proteinchromatographie

Bereich vieler IEC-Isothermen, d.h. sowohl linear als auch nicht-linear, beschreiben kann [Brooks et al. 1992]. Dieses Modell stellt eine Weiterentwicklung des „Stöchiometrischen Verdrängungsmodells“ (engl. Stochastic Displacement Model, SDM) von *Kopaciewicz et. al.* dar, welches einen quantitativen Austausch von Gegenionen ausgehend von Größe und Nettoladung des Proteins unter den eingestellten Bedingungen postuliert [Kopaciewicz et al. 1983]. Es basiert somit direkt auf fundamentalen Gesetzmäßigkeiten der Elektrostatischen Wechselwirkung und des Massenwirkungsgesetzes und wird mit dem SMA-Modell im wesentlichen durch eine sterische Komponente, mit der die Fixierung von Gegenionen in Einbuchtungen adsorbierter Proteine beschrieben wird, sowie eine Gesamtionenkapazität des Adsorbens erweitert. Die Modellparameter werden an experimentelle Daten angepasst, die spezifisch für ein bestimmtes Puffersystem, d.h. einen bestimmten pH-Wert, einen Salztyp bei variablen Salzkonzentrationen, sowie Protein- und Adsorbensart sind. Eine Extrapolation auf andere pH-Werte oder Salztypen ist bei dem SMA-Modell nicht möglich. Weitere Limitierungen sind die Beschränkungen des Modells auf wenige, gut quantifizierbare und homogene Molekülspezies, so dass industrierelevantes Ausgangsmaterial mit unterschiedlich glykosylierten Zielproteinen und kontaminiert mit Spuren von DNA und Wirtszellproteinen nicht geeignet ist [Iyer et al. 1999].

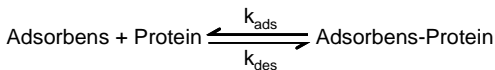
Ein analoges Modell für die Beschreibung der HIC existiert nicht. Klassische Modelle wie die von *Melander et. al.* entwickelte ‚Solvophobic Theory‘ [Melander et al. 1977; Melander et al. 1984] oder die ‚Preferential Interaction Theory‘ von Perkins et. al. [Perkins et al. 1997] zielen auf die Beschreibung des dimensionslosen Retentionsfaktors k' ab, der in (53) definiert ist. Sie gelten somit nur für den linearen Teil der jeweilig zugrunde liegenden Isothermen. Aktuelle Arbeiten von *Salgado et. al.* verfolgen dasselbe Ziel unter Verwendung der ‚Hydrophobic Imbalance‘ sowie der Berechnung der statistischen Verteilung von Aminosäuren auf der Proteinoberfläche (Salgado et al. 2006; Salgado et al. 2006). Ein relativ aktueller Review Artikel liegt von *Lienqueo et. al.* vor [Lienqueo et al. 2007].

Das Bilanzmodell, welches in dieser Arbeit verwendet wird, beinhaltet die in der präparativen Chromatographie gebräuchliche, empirische Beziehung nach *Langmuir*.

2 Theoretische Grundlagen

Das Modell nach *Langmuir*

Eine der meist verwendeten Beziehungen zur Beschreibung von zeit(un)abhängigen Sorptionsvorgängen ist das Modell nach *Langmuir* [Langmuir 1916]. Die zugrunde liegende Hypothese eines reversiblen Übergangs zwischen zwei Zuständen, die ebenfalls zur Beschreibung von Enzymaktivitäten (Michaelis-Menten-Kinetik) Verwendung findet, dient im Fall der Proteinsorption der Beschreibung von Adsorption und Desorption eines Proteins auf, bzw. von einem Adsorbens.



Die Geschwindigkeitskonstanten k_{ads} und k_{des} charakterisieren die jeweilige Sorptionsrate. Die Verwendung von Konstanten impliziert für den Fall der Proteinsorption auf porösen Adsorbentien folgende Hypothesen:

- Sämtliche Bindungsplätze auf dem Adsorbens sind thermodynamisch äquivalent, d.h. die Bindungsaffinität ist zu allen Plätzen gleich stark ausgeprägt.
- Bereits gebundenes Protein hat keinen Einfluss auf die Bindung von nachfolgendem Protein in seiner Nähe.
- Die Belegung des Adsorbens kann nur in monomolekularer Schicht erfolgen.

Diese Annahmen treffen für die präparative Proteinchromatographie praktisch nie zu, trotzdem wird das Modell aufgrund der guten Beschreibbarkeit vieler experimenteller Daten als empirischer Ansatz verwendet.

Für die Änderung der Adsorbensbeladung, d.h. der Proteinkonzentration auf dem Adsorbens, ergibt sich ein Geschwindigkeitsgesetz zweiter Ordnung nach (1).

$$\frac{dq(t)}{dt} = k_{\text{ads}} c(t) (q_{\text{max}} - q(t)) - k_{\text{des}} q(t) \quad (1)$$

Nach Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts wird der Differentialkoeffizient zu Null und mit der Einführung einer eigenen Variablen für den Koeffizienten der beiden Geschwindigkeitskonstanten in (2)

2.1 Grundlagen der Proteinchromatographie

$$K_a = \frac{k_{ads}}{k_{des}} ; K_d = \frac{k_{des}}{k_{ads}} = \frac{1}{K_a} \quad (2)$$

ergibt sich die bekannte Form der Langmuir-Gleichung in zeitunabhängiger Form in (3).

$$q^* = \frac{K_a c^* q_{max}}{K_a c^* + 1} = \frac{c^* q_{max}}{c^* + K_d} \quad (3)$$

Die *Langmuir*-Parameter besitzen für die präparative Proteinchromatographie keine physikalische Bedeutung mehr, bieten sich aber gerade für einfache Auswertungen von Isothermen- und Kinetikmessungen sowie für empirische Korrelationen in Bilanzmodellen an.

2.1.5 Stofftransport in Flüssigphasen

Der Transport von gelösten Stoffen in einer Flüssigphase kann auf zwei Arten stattfinden:

- i) Durch Konvektion; in der Proteinchromatographie durch den Partikelzwischenraum des gepackten Säulenbetts.
- ii) Durch Diffusion; in der Proteinchromatographie sowohl durch den Fluidfilm, der die Adsorbenspartikel als laminare Grenzschicht umgibt als auch im Inneren der Partikel. Im Partikelinneren wird der diffusive Transport oft behindert, bzw. verlangsamt, was in Kapitel 2.2.1 beschrieben wird. Im Folgenden werden hingegen die Grundlagen der Diffusion, d.h. die Diffusion in freier Lösung beschrieben.

Konvektion

Beim konvektiven Stofftransport wirkt die für den Transport ursächliche Triebkraft, die dem System in Form von mechanischer oder thermischer Energie

2 Theoretische Grundlagen

zugeführt werden kann, nicht auf die gelösten Stoffe selbst, sondern auf die sie umgebende und lösende Flüssigkeit. Dieser Transport ist zielgerichtet und schneller als die ungerichtete Molekularbewegung nach *Brown*, so dass die gelösten Stoffe durch das Säulenbett transportiert werden. Im absatzweisen Betrieb wird bei ausreichender Durchmischung eine konstante Flüssigphasenkonzentration erreicht. Dies ist auch bei der Erstellung des Bilanzmodells für einen Einzelpartikel bei der Kopplung der Bulkfluidkonzentration mit der Konzentration in der äußersten Adsorbenschale über den Filmtransport berücksichtigt und in (22) und (23) dargestellt.

Diffusion in Freier Lösung

Diffusion ist ein Transportvorgang auf molekularer Ebene, der auf der von *Brown* wiederentdeckten, thermisch getriebenen, stochastischen Eigenbewegung von Molekülen beruht [Brown 1828]. Die allgemeine Diffusionsgleichung resultiert aus einer Kräftebilanz zwischen Triebkraft und Reibungskraft [Wesseling et al. 2000]. Die molspezifische Triebkraft, welche auf die Komponente i wirkt, kann durch einen negativen Gradienten des chemischen Potentials / der partiellen molaren Gibbs-Energie in (4) beschrieben werden.

$$K_{m,i}^{\text{Trieb}} = - \frac{\partial \mu_i}{\partial z} = - \frac{\partial \bar{G}_i}{\partial z} = - \frac{\partial}{\partial z} \left(\frac{\partial G}{\partial n_i} \Big|_{p,T,n_{j \neq i}} \right) \quad (4)$$

Die auf die Komponente i wirkende Reibungskraft ergibt sich aus der Summe der Stoßvorgänge zwischen der Komponente i und den anderen Komponenten j des Stoffgemisches. Sie ist somit dem Produkt aus Molenbruch der anderen Komponenten j sowie deren Geschwindigkeitsunterschieden zu Komponente i proportional, dargestellt in (5).

$$K_{m,i}^{\text{Reibung}} = \sum_{j \neq i} \zeta_{i,j} x_j (u_i - u_j) \quad (5)$$

2.1 Grundlagen der Proteinchromatographie

Wird nun eine Kräftebilanz zwischen beiden Kräften aus (4) und (5) aufgestellt und der Proportionalitätsfaktor aus (5), der Reibungskoeffizient $\zeta_{i,j}$, durch den Diffusionskoeffizienten $D_{i,j}$ nach *Stefan-Maxwell* substituiert, ergibt sich die allgemeine *Stefan-Maxwell*-Diffusionsgleichung in (6). Bezieht sich der Reibungskoeffizient $\zeta_{i,j}$ auf einen einzelnen Partikel, so ist der Diffusionskoeffizient auf die Stoffmenge der Partikel bezogen, ausgedrückt durch die Avogadro-Zahl N_A . Wird die Bewegungsenergie eines Partikels bei einer bestimmten Temperatur berücksichtigt, ist die Stoßzahl k nach *Boltzmann* zur Beschreibung dieser Größe geeignet. Das Produkt aus $k \times N_A$ ergibt die universelle Gaskonstante R , mithin die temperaturspezifische Bewegungsenergie von einem Mol Partikeln.

$$\sum_{j \neq i} \frac{R T}{D_{i,j}} x_j (u_i - u_j) = - \frac{\partial \mu_i}{\partial z} \quad (6)$$

Aus Gründen der Vereinfachung können die Reibungskräfte der gelösten Komponenten untereinander vernachlässigt werden, da es sich um stark verdünnte Lösungsmittel handelt ($x_{\text{Wasser}} \approx 1$). Zudem handelt es sich bei den betrachteten Systemen um poröse Partikel, die in wässriger Lösung suspendiert sind, so dass bei Anwendung der Gleichung zur Beschreibung von Porendiffusionsvorgängen von einer stationären Porenflüssigkeit auszugehen ist ($u_{\text{Lösungsmittel}} = 0$). Die vereinfachte *Stefan-Maxwell*-Diffusionsgleichung lautet somit nach (7):

$$\frac{R T}{D_{\infty,i}} u_i = - \frac{\partial \mu_i}{\partial z} \quad (7)$$

Eine weitere Vereinfachung der allgemeinen Diffusionsgleichung nach *Stefan-Maxwell* ist nach *Fick* gebräuchlich. Dabei werden die unabhängigen Variablen Druck (p) und Temperatur (T) bei der Berechnung des chemischen Potentials μ_i vernachlässigt, bzw. als konstant gesetzt, wodurch sich (8) ergibt.

$$\mu_i = R T \ln x_i \quad (8)$$

2 Theoretische Grundlagen

Setzt man (8) in (7) ein und erweitert die lineare Stoffflussgeschwindigkeit (u_i) mit der Stoffkonzentration (c_i), ergibt sich (9) nach *Fick*.

$$J_i = u_i c_i = -D_{\infty,i} c_i \frac{\partial \ln x_i}{\partial z} = -D_{\infty,i} \frac{c_i}{x_i} \frac{\partial x_i}{\partial z} = -D_{\infty,i} \frac{\partial c_i}{\partial z} \quad (9)$$

Triebkraft der Diffusion der Komponente i ist nunmehr alleine der Konzentrationsgradient dieser Komponente, der Stofffluss J verhält sich proportional zu dem negativen Konzentrationsgradienten ($-\partial c/\partial x$). Der Diffusionskoeffizient (D) ist für eine konstante Temperatur und dynamische Viskosität ebenfalls konstant, dargestellt in (10).

$$\frac{D_{\infty,i} \eta_B}{T} = \text{const} \quad (10)$$

Tyn & Gusek haben für den Diffusionskoeffizienten globulärer Proteine in einem Größenbereich zwischen 20 und 200 kDa und in verdünnter wässriger Lösung experimentell eine Abhängigkeit von der molspezifischen Masse gefunden [Tyn et al. 1990], dargestellt in (11).

$$D_{\infty,i} \propto 2,7 \cdot 10^{-5} (m_m)^{\frac{1}{3}} \quad (11)$$

Das Proportionalitätszeichen wurde aufgrund des experimentell nicht bestimmaren Ordinatenabschnitts gewählt, innerhalb der oben beschriebenen Grenzen gilt das Gleichheitszeichen.

2.2 Erstellung des Bilanzmodells für einen Einzelpartikel

Der intrapartikuläre Stofftransport erfolgt ebenfalls durch Diffusion, diese wird allerdings im Gegensatz zur Diffusion in freier Lösung durch mehrere Faktoren, wie z.B. das Porenlabyrinth im Partikelinneren, behindert. Eine Beschreibung und

2.2 Erstellung des Bilanzmodells für einen Einzelpartikel

Charakterisierung dieses Stofftransports ist oft nur über die Anpassung der experimentellen Daten an Modellparameter eines Bilanzmodells möglich, wobei oft ein effektiver Porendiffusionskoeffizient die verlangsamte Transportrate im Inneren des Partikels quantifiziert. Bilanzmodelle sind virtuelle Abbildungen des untersuchten chromatographischen Systems basierend auf differentiellen Massen- oder Mengenzbilanzen [Susanto 2006]. Das in dieser Arbeit verwendete Bilanzmodell wird in Kapitel 2.2.3 beschrieben. Die Transportbehinderung kann dabei auf zwei unterschiedliche Arten beschrieben werden:

- Durch direkte Reduzierung des freien Porendiffusionskoeffizienten, der in (9) beschrieben ist. Dieser Ansatz wurde z.B. von *Chen et. al.* [Chen et al. 2002] verfolgt und findet auch bei dem in dieser Arbeit verwendeten Modell von *Susanto et. al.* [Susanto 2006; Susanto et al. 2007] Verwendung.
- Durch Verringerung der Porenzugänglichkeit unter Beibehaltung des unbehinderten Diffusionskoeffizienten. Dieser Ansatz wurde z.B. von *Kaczmarzski et. al.* oder *Garke et. al.* [Garke et al. 2000; Kaczmarzski et al. 2003] verfolgt. Dieser Ansatz wird in dieser Arbeit nicht verwendet.

2.2.1 Definition des effektiven Porendiffusionskoeffizienten

Der in dieser Arbeit verwendete Porendiffusionskoeffizient leitet sich aus der vereinfachten *Stefan-Maxwell* Gleichung ab, wie sie in (7) dargestellt und erläutert ist.

Der Bilanzraum für die stationäre Porenflüssigkeit wird als mittleres Kugelvolumen der Schar an Adsorbenspartikeln definiert und ist in (12) und **Bild 2.3** dargestellt.

$$V_{BR} = \frac{4}{3} \pi \bar{R}^3 = \frac{4}{3} \pi R_P^3 \quad (12)$$

Aufgrund der experimentellen Gegebenheiten variierte der Partikeldurchmesser bei der CLSM-Analyse zwischen 88 und 96 μm , wie in Kapitel 3.2.4 dargestellt.

2 Theoretische Grundlagen

Die Profile aller gemessenen Partikel wurden dann auf den mittleren Radius $\bar{R} = R_p$ normiert.

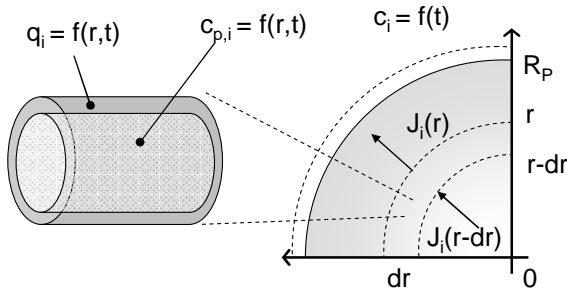


Bild 2.3: Bilanzraum, Stoffflüsse und Proteinkonzentrationen.

Der Stofffluss J der Komponente i wird innerhalb einer infinitesimal kleinen Adsorbensschale mit den Grenzen r und $(r-dr)$ bilanziert. Das Volumen einer Adsorbensschale setzt sich aus Porenflüssigkeit und Adsorbensmatrix

zusammen. Die Konzentration in der Pore c_p der Komponente i ist eine Funktion des Radius r und der Zeit t . Die Beladung q der Komponente i an der Adsorbensmatrix ist eine Funktion der korrespondierenden Konzentration in der Porenflüssigkeit c_p . Da es sich um Finite Bath Experimente handelt ist Konzentration der Komponente i in der extrapartikulären Flüssigkeit homogen verteilt und damit lediglich eine Funktion der Zeit.

In dem Bilanzraum V_{BR} werden in dem Modell vereinfacht drei Stoffkomponenten betrachtet: Das Lösungsmittel (1), adsorbiertes Protein (2) und gelöstes Protein (3). Die Gesamtmenge ergibt sich aus der Summe der drei Komponenten, wie in (13) gezeigt.

$$n_{ges} = n_1 + n_2 + n_3 \quad (13)$$

Wie bereits in der Erläuterung zu (7) erwähnt, wird in einer vereinfachenden Annahme die Reibung der gelösten Stoffe untereinander vernachlässigt, so dass lediglich die Reibung des gelösten Proteins mit dem Lösungsmittel und dem bereits adsorbierten Protein betrachtet werden muss, formuliert in (14).

$$\frac{R T}{D_{\infty,3}} u_3 + \frac{R T}{D_{2,3}} x_2 u_3 = R T u_3 \left(\frac{1}{D_{\infty,3}} + \frac{x_2}{D_{2,3}} \right) = - \frac{\partial \mu_3}{\partial z} \quad (14)$$

2.2 Erstellung des Bilanzmodells für einen Einzelpartikel

Da das bereits adsorbierte Protein als stationär angenommen werden kann, ist (14) jeweils für eine diskrete Adsorbensbeladung gültig. Der Porendiffusionskoeffizient $D_{p,3}$ beschreibt einen verlangsamten Stofftransport der Komponente 3 im Vergleich zu der Diffusion in einer stark verdünnten Lösung, die durch den entsprechenden Diffusionskoeffizienten $D_{\infty,3}$ beschrieben wird. $D_{p,3}$ ist dabei in etwa umgekehrt proportional zu dem Produkt aus bereits erfolgter Beladung q und dem Hinderungsparameter γ , wie aus einem Vergleich von (7) und (14) folgt und in (15) dargestellt ist:

$$D_{p,3} = \left(\frac{1}{D_{\infty,3}} + \frac{x_2}{D_{2,3}} \right)^{-1} = \frac{D_{\infty,3} D_{2,3}}{D_{2,3} + x_2 D_{\infty,3}} = \frac{D_{\infty,3}}{1 + x_2 \frac{D_{\infty,3}}{D_{2,3}}} = \frac{D_{\infty,3}}{1 + q \gamma} \quad (15)$$

Der Stoffmengenanteil x_2 an adsorbiertem Protein wird dabei durch die in der Chromatographie gebräuchliche Kapazität q ersetzt, welche eine Konzentrationsangabe in mol Protein pro ml Adsorbensvolumen ist. Dies ist für das Einzelpartikelmodell gleichbedeutend mit dem Volumen des Bilanzraumes V_{BR} , definiert in (12), wie in (16) gezeigt:

$$q = \frac{n_2}{V_{BR}} = \frac{x_2 n_{ges}}{V_{BR}} \quad (16)$$

Der Behinderungsparameter γ fasst somit das Verhältnis aus freiem und durch bereits adsorbierte Proteine im Partikelinneren behindertem Diffusionskoeffizient zusammen. Dieses Verhältnis wird als Vielfaches der Gesamtkonzentration aller drei Stoffkomponenten im Bilanzraum in (17) ausgedrückt.

$$\gamma(q) = \frac{D_{\infty,3}}{D_{2,3}} \left(\frac{n_{ges}}{V_{BR}} \right)^{-1} \quad (17)$$

Die intrapartikuläre Diffusion wird innerhalb der porösen Partikel zudem noch durch die sterischen Eigenschaften des Partikels beeinflusst. Die Partikelporosität

2 Theoretische Grundlagen

ε_p gibt den Anteil des Hohlraums am Gesamtvolumen des Partikels V_{BR} an. Der Tortuositätsfaktor τ beschreibt die effektive Weglänge, welche die gelösten Stoffe in dem realen Porenlabyrinth im Vergleich zu einer idealen, direkt zentrisch zulaufenden Pore zurücklegen müssen. Der effektive Porendiffusionskoeffizient $D_{P, \text{eff}, 3}$ berücksichtigt diese sterischen Größen und ist in (18) definiert.

$$D_{P, \text{eff}, 3} = D_{P, 3} \frac{\varepsilon_p}{\tau} = \frac{\varepsilon_p}{\tau} \frac{D_{\infty, 3}}{1 + q \gamma} \quad (18)$$

2.2.2 Erweiterung des effektiven Porendiffusionskoeffizienten

Der im vorigen Kapitel definierte effektive Porendiffusionskoeffizient kann unter Berücksichtigung von zwei anstatt wie bis dato einem Transportregime erweitert werden.

Der Einführung eines zweiten Transportregimes liegt die Hypothese zugrunde, dass die Struktur und / oder die Konformation bereits adsorbierter Proteine mit zunehmender Beladung stabilisiert wird.

Die zweite Hypothese postuliert, dass Proteine im nativen Faltungszustand / in einer Raum greifenderen Konformation (im Folgenden: ‚nativ‘) einen stärkeren sterischen Hinderungsfaktor darstellen als (partiell) entfaltete Proteine, bzw. Proteine in einer weniger Raum greifenden Konformation (im Folgenden: ‚entfaltet‘).

Der Hinderungsparameter γ kann somit durch den Mengenanteil an nativem Protein erweitert werden, der durch eine generelle Potenzfunktion von dem Beladungsgrad der Adsorbentien abhängt, wie in (19) und (20) dargestellt.

$$x_{\text{nativ}, 3} = \left(\frac{q}{q_{\text{max}}} \right)^n \quad (19)$$

$$x_{\text{entfaltet}, 3} = 1 - x_{\text{nativ}, 3} \quad (20)$$

Der Anteil des nativen adsorbierten Proteins an der Gesamtmenge des adsorbierten Proteins ist somit eine Funktion dessen relativer Kapazität. Somit

2.2 Erstellung des Bilanzmodells für einen Einzelpartikel

ergibt sich für den effektiven Porendiffusionskoeffizienten unter Berücksichtigung dieser zwei Transportregime der in (21) definierte Zusammenhang.

$$D_{P,eff,3} = D_{eff,3} \frac{\varepsilon_p}{\tau} = \frac{\varepsilon_p}{\tau} \frac{D_{\infty,3}}{1 + (x_{nativ,3} \gamma_{nativ,3} + x_{entfaltet,3} \gamma_{entfaltet,3})q} \quad (21)$$

Bei Berücksichtigung des erweiterten Porendiffusionskoeffizienten bei der Datenanpassung wird (18) durch (19) - (21) substituiert.

2.2.3 Differentielle Massenbilanzen

Die Abnahme der Proteinkonzentration der homogenen Bulk-Flüssigphase, $c_{B,i}$, mit der Zeit t wird durch eine differentielle Massenbilanz in (22) beschrieben.

$$\frac{\partial c_{B,i}}{\partial t} = \frac{V_{\text{Adsorbens}}}{V_B} \frac{3}{R_p} J_i \Big|_{r=R_p} \quad (22)$$

Diese Konzentrationsabnahme ist neben dem Volumenverhältnis von Adsorbens und Bulk-Flüssigphase $V_{\text{Adsorbens}} / V_B$ sowie der volumenspezifischen Adsorbensoberfläche $3 / R_p$ auch vom Stofffluss am Partikelrand $J_i \Big|_{r=R_p}$ abhängig. Dieser ist über die Filmdiffusion an die Massenbilanz in der Bulk-Flüssigphase gekoppelt. Die Filmdiffusion ist analog zu dem Gesetz nach *Fick* aus (9) das Produkt aus Filmdiffusionskoeffizient $k_{\text{film},i}$ und Konzentrationsgradient zwischen Bulk-Flüssigphase $c_{B,i}$ und Partikelrand $c_{P,i} \Big|_{r=R_p}$, dargestellt in (23).

$$J_i \Big|_{r=R_p} = k_{\text{film},i} (c_{P,i} \Big|_{r=R_p} - c_{B,i}) \quad (23)$$

Für einen Bilanzraum innerhalb des Adsorbenspartikels, der sowohl Porenflüssigkeit als auch Adsorbensmatrix enthält, wird ebenfalls eine differentielle Massenbilanz in (24) aufgestellt. Mit der Porenkonzentration $c_{P,i}$, der Beladung q_i , der Partikelporosität ε_p , dem Radius r und dem Stofffluss J_i ergibt sich:

2 Theoretische Grundlagen

$$\left(\varepsilon_p \frac{\partial c_{p,i}}{\partial t} + \frac{\partial q_i}{\partial t} \right) = - \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} (r^2 J_i); \quad r = [0, R_p] \quad (24)$$

Innerhalb des Partikels wird die Porendiffusion durch das Gesetz nach *Fick* wie in (9), beschrieben, hier noch mal in (25) definiert.

$$J_i = -D_{p,eff,i} \frac{\partial c_{p,i}}{\partial r} \quad (25)$$

Der effektive Porendiffusionskoeffizient $D_{p,eff,i}$ in (26) wurde bereits in (18) eingeführt.

$$D_{p,eff,i} = D_{\infty,i} \frac{\varepsilon_p}{\tau} \frac{1}{1 + \gamma_i q_i} \quad (26)$$

Der Diffusionskoeffizient in einer ideal verdünnten Lösung, $D_{\infty,i}$ wird nach der empirischen Korrelation von *Tyn und Gusek* beschrieben, die in (11) eingeführt wurde und die Molekularmasse m_m eines Proteins berücksichtigt. Hier ist die Gleichung noch mal in (27) dargestellt.

$$D_{\infty,i} = 2,7 \cdot 10^{-5} (m_m)^{\frac{1}{3}} \quad (27)$$

Für die Partikelporosität wird ein Wert von 0,9 angenommen [To et al. 2007], der Tortuositätsfaktor τ wird nach einer empirischen Korrelation von *Suzuki und Smith* [Suzuki et al. 1972], beschrieben in (28), unter Berücksichtigung der Partikelporosität ε_p berechnet.

$$\tau = \varepsilon_p + 1,5 (1 - \varepsilon_p) \quad (28)$$

2.2 Erstellung des Bilanzmodells für einen Einzelpartikel

Die Änderung der Adsorbenskapazität q_i über der Zeit wird über die Beziehung nach Langmuir beschrieben, die in (1) eingeführt wurde. Hier ist sie noch mal in (29)

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = k_{\text{ads},i} c_{\text{P},i} (q_{\text{max},i} - q_i) - k_{\text{des},i} q_i \quad (29)$$

zusammen mit der Affinitätskonstanten K_a in (30) dargestellt.

$$K_{a,i} = \frac{k_{\text{ads},i}}{k_{\text{des},i}} \quad (30)$$

Sämtliche in diesem Kapitel dargestellten Gleichungen, von (22) bis (30), wurden in ein MATLAB-Skript implementiert. Dieses aus Differential- und algebraischen Gleichungen (DAE) bestehende Gleichungssystem wurde mittels der bereits standardmäßig verfügbaren Funktion *ode15s* gelöst. Zum Zeitpunkt $t=0$ befinden sich alle Proteine außerhalb der Adsorbentien. Daher lauten die Anfangsbedingungen für das Modell:

- $q_i(r = [0, R_P], t = 0) = 0$
- $c_{\text{P},i}(r = [0, R_P], t = 0) = 0$
- $c_{\text{B},i}(t = 0) = c_0$

2.3 Eigenschaften wässriger Lösungen

Unter den häufigsten Trennprinzipien in der präparativen Proteinchromatographie, AC, IEC und HIC, ist die HIC das einzige Trennprinzip, bei dem die Interaktion zwischen Protein und Adsorbens indirekter Natur ist. Die Bindung zwischen Protein und Adsorbens basiert dabei nicht auf der direkten Affinität der beiden Molekülspezies zueinander, sondern beide werden durch das Lösungsmittel Wasser in räumlicher Nähe zueinander fixiert, womit dieses auf die Zugabe von Modifikatoren wie Salzen reagiert. Die Trennung in der HIC basiert somit

2 Theoretische Grundlagen

vornehmlich auf den Eigenschaften des Lösungsmittels Wasser sowie den Effekten, die Modifikatoren wie Salze auf dieses Lösungsmittel haben.

2.3.1 Lösungseigenschaften von Wasser

Struktur des Wassers

Die Struktur des Wassers ist auf nanoskopischer Ebene inhomogen. Zwei unterschiedliche intermolekulare Anordnungen der Wassermoleküle sind energetisch stabil und treten in Konkurrenz zueinander. Sie werden durch das Mengenverhältnis von zwei unterschiedlichen Arten von intermolekularen Wechselwirkungen beeinflusst, den unspezifischen Van-der-Waals Wechselwirkungen sowie den gerichteten Wasserstoffbrückenbindungen.

In einer Hochdichte-Anordnung sind die Wassermoleküle in räumlich dichtester Packung arangiert, wodurch die Anzahl von unspezifischen Van-der-Waals Wechselwirkungen zwischen den Molekülen maximiert ist. Die Anzahl an gerichteten Wasserstoffbrückenbindungen ist bei dieser Anordnung geringer, wodurch die räumliche Fixierung der Wassermoleküle ebenfalls minimiert und der Entropiegehalt der Lösung somit maximiert ist. Diese Wasserstruktur dominiert bei Temperaturen über 4° C und hat eine Dichte von 1 g cm⁻³.

In einer Niedrigdichte-Anordnung überwiegen die gerichteten Wasserstoffbrückenbindungen, welche einen höheren Energiegehalt haben als die unspezifischen Van-der-Waals Wechselwirkungen. Somit ist die Packungsdichte der Wassermoleküle im Raum geringer und der Ordnungsgrad ist durch die größere Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungsdonoren und -akzeptoren in ihrer räumlichen Fixierung höher. Dieser Zustand ist somit entropisch ungünstiger als die Hochdichte-Anordnung, ist aber in reinem Wasser bei Temperaturen unter 4° C enthalpisch durch die höhere Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen begünstigt. Wasser hat nach Modellrechnungen bei dieser Anordnung eine Dichte von 0,94 g cm⁻³ [Luck 1985].

2.3 Eigenschaften wässriger Lösungen

Proteinlösungen

Bei der Lösung von Proteinen, die aus einer Mischung aus polaren und unpolaren Gruppen bestehen, ist die Struktur des Wassers bis zu einer Tiefe von 1nm beeinträchtigt [Ebbinghaus et al. 2007], was etwas mehr als drei Hydrathüllen oder Schichten von Wassermolekülen entspricht. Die Anordnung der Wassermoleküle ist dabei um die polaren Gruppen, hauptsächlich die positiv geladenen, basischen Aminosäuren, am dichtesten und durch Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Wechselwirkungen bestimmt. Die erste Hydrathülle besteht aus hochgradig geordneten Wassermolekülen mit stark ausgeprägten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Wassermolekülen und der Proteinoberfläche, die von ihrer Bindungsenergie stärker sind als die intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen der Wassermoleküle in reinem Wasser. Um die unpolaren Gruppen bildet sich hauptsächlich Wasser in der Niedrigdichte-Anordnung, wo ebenfalls gerichtete Wasserstoffbrückenbindungen dominieren.

Alle wasserlöslichen Proteine bestehen somit bezüglich ihres Effekts auf das sie umgebende Wasser gemäß der Definition nach Hofmeister [Hofmeister 1888] aus zwei Klassen von Agenzien: Den polaren sowie den unpolaren kosmotropen Agenzien. Kosmotrope Agenzien erhöhen den Ordnungsgrad des Wassers, indem sie die Wassermoleküle in ihrer Beweglichkeit, d.h. bzgl. Translation und Rotation, einschränken und somit die Entropie dieses Molekülverbandes minimieren. Die polaren kosmotropen Agenzien haben dabei sehr viel stärkere Wechselwirkungen mit der sie umgebenden ersten Hydrathülle, die unpolaren kosmotropen Agenzien sehr viel schwächere. In beiden Fällen werden durch die beiden ‚Extremsituationen‘ an der Phasengrenzfläche die Wassermoleküle sehr strukturiert angeordnet, wodurch in einem Kaskadeneffekt in den darauffolgenden Hydrathüllen die enthalpisch begünstigten gerichteten Wasserstoffbrückenbindungen überwiegen [Luck 1985].

Salzeffekte

Durch Zugabe von Salzen lassen sich die Lösungseigenschaften des Wassers modifizieren. Der Effekt der Salze auf die Löslichkeit von hydrophilen

2 Theoretische Grundlagen

Makromolekülen und damit auch von der Mehrzahl an wasserlöslichen Proteinen lässt sich wiederum durch die Hofmeister-Reihe [Hofmeister 1888] ausdrücken. Die Rangfolge der Salze in der *Hofmeister-Reihe* ist dabei reproduzierbar mit einer Vielzahl verschiedenartiger experimenteller Methoden bestimmbar. *Collins et. al.* [Collins et al. 1985] listen über 40 verschiedene Methoden in ihrem Review-Artikel auf, z.B. Änderungen in der Oberflächenpotentialdifferenz von Wasser an Luft-Wasser-Grenzflächen. Die Effekte dieser Salze werden von Anionen dominiert, sind weitestgehend additiv und ab einem Konzentrationsbereich von 0,01 – 1M sichtbar. Eine repräsentative Reihe für Anionen ist in (31) dargestellt, die Anordnung erfolgt dabei anhand der Elutionsreihenfolge der Salzanionen von einer Sephadex® G-10 Säule [Washabaugh et al. 1986].



Die Anionen links von Cl^- werden dabei als polare kosmotrope Agenzien klassifiziert, sie erhöhen den Ordnungsgrad im Wasser und stabilisieren die interne Proteinstruktur in Lösung. Allerdings erzielen sie schon bei geringen Konzentrationen im zweistelligen millimolaren Bereich einen Aussalzeffekt, da sie die Zusammenlagerung von mehreren Proteinmolekülen fördern und diese größeren Aggregate schwerer in Lösung zu halten sind. Im selben Konzentrationsbereich erzeugen sie auch eine starke Triebkraft für die Adsorption an hydrophobe Liganden, wie sie bei der HIC Verwendung finden. Die Anionen rechts von Cl^- werden als chaotrope Agenzien klassifiziert, sie verringern den Ordnungsgrad des Wassers und wirken prinzipiell destabilisierend auf die interne Proteinstruktur, wofür praktisch allerdings eine höhere Salzkonzentration nötig ist. Sie erhöhen in geringen Konzentrationen die Löslichkeit der Proteine, was auch als ‚Einsalzeffekt‘ bezeichnet wird. Die chaotropen Agenzien sind bezüglich der Stärke ihrer Wechselwirkung mit der ersten Hydrathülle zwischen den beiden Klassen von kosmotropen Agenzien zu positionieren, wie sie im vorigen Kapitel beschrieben sind. Sie haben geringfügig schwächere Wechselwirkungen mit den Wassermolekülen als diese untereinander. Hier ist die räumliche Fixierung der

2.3 Eigenschaften wässriger Lösungen

ersten Hydrathülle geringer als in reinem Wasser und die Entropie dieses Molekülverbandes somit größer.

2.3.2 Hydrophobizität von Proteinen

Neben dem Einfluss der verwendeten Salze auf die Löslichkeit von Proteinen und korrespondierend dazu deren Adsorptionsneigung auf HIC Adsorbentien spielen die Oberflächeneigenschaften der jeweils verwendeten Proteine eine große Rolle. Je größer dabei der Anteil an unpolaren Gruppen auf der Proteinoberfläche ist, desto stärker ausgeprägt ist die Hydrophobizität des Proteins und damit auch dessen Präzipitations- und Adsorptionsneigung auf HIC Adsorbentien. Die Klassifizierung von Proteinen anhand ihrer Hydrophobizität geschieht im einfachsten Fall, analog zu der einfachsten theoretischen Bestimmung des isoelektrischen Punktes eines Proteins, anhand der Primärsequenz.

Die Arbeitsgruppe um *Tanford* bestimmte die Differenz der freien Lösungsenthalpien von Aminosäuren in einer unpolaren wässrigen Harnstoff-Lösung im Vergleich zu reinem Wasser (Whitney et al. 1962; Nozaki et al. 1963). Diese Werte sind für 13 Aminosäuren positiv, d.h. die Lösung dieser Aminosäuren in dem unpolaren Lösungsmittel im Vergleich zu Wasser ist energetisch günstiger. Basierend auf diesen Daten berechnete *Bigelow* die nach ihm benannte *Bigelow* Hydrophobizität durch simple Addition dieser ΔG Werte multipliziert mit der Anzahl der entsprechenden Aminosäure [Bigelow 1967]. Analoge Modelle, wie das des Hydrophoben Anteils (engl. hydrophobic ratio), bestimmten lediglich den Volumenanteil der unpolaren Aminosäuren Ile, Leu, Val, Phe und Met basierend auf deren Primärsequenz. In einem weitergehenden Ansatz nach *Fraczkiewicz et. al.* wird der unpolare Anteil an der durch das Lösungsmittel zugänglichen Proteinoberfläche ermittelt [Fraczkiewicz 1998].

2.3.3 Eigenschaften biochemischer Puffer

Einer der wichtigsten Prozessparameter in der präparativen Proteinchromatographie ist der pH-Wert, der mittels Puffersalzen weitestgehend konstant gehalten wird. Die Schwankungen in der Hydronium-Ionenkonzentration

2 Theoretische Grundlagen

werden durch gegenläufige Assoziationen oder Dissoziationen des eingesetzten Puffersalzes ausgeglichen. Der Zusammenhang zwischen dem pH-Wert und der Dissoziationskonstante des Puffersalzes, pK_S , wird für Puffer mit geringer Ionenstärke durch die Henderson-Hasselbalch-Gleichung in (32) beschrieben.

$$pH = pK_S + \log \frac{a(\text{Protonenakzeptor})}{a(\text{Protonendonor})} \quad (32)$$

Der pH-Wert definiert sich somit durch den pK_S -Wert des Puffersalzes, addiert zu dem logarithmierten Aktivitätsquotienten aus Protonenakzeptor- und -donor. Für Puffer mit einer Ionenstärke von bis zu 0,5 M kann deren Einfluss auf den pK_S Wert durch die Deybe-Hückel-Gleichung in (33) quantifiziert werden.

$$pK'_{S,IS} = pK_S + (2z_S - 1) \left[\frac{A\sqrt{I}}{(1 + \sqrt{I})} - 0,1I \right] \quad (33)$$

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n (c_i z_i^2) \quad (34)$$

Der um den Einfluss der Ionenstärke korrigierte, effektive pK_S Wert $pK'_{S,IS}$ wird durch die Ladung z_S der Säure des korrespondierenden Säure-Basen-Paares des Puffersalzes, die Ionenstärke I ((38)) sowie die Konstante A beeinflusst. A ist temperaturabhängig und hat einen Wert von 0,5070 bei 20°C und von 0,5114 bei 25°C. $pK'_{S,IS}$ kann iterativ unter Verwendung von (32) und (33) ermittelt werden. Der Einfluss der Temperatur auf den pK_S -Wert wird durch den pH-Wert Drift bei veränderter Temperatur bestimmt und hat für den pK_{S2} des Phosphat-Puffersalzes einen Wert von $-0,0028 \Delta pK_{S2} / \Delta T$.

Die Einflüsse der Ionenstärke und der Temperatur auf den pK_S Wert verhalten sich additiv, wie in (35) dargestellt.

$$pK'_{S,total} = pK_S + \Delta pK_{S,IS} + \Delta pK_{S,T} \quad (35)$$

Bei Puffern mit einer Ionenstärke von mehr als 0,5M müssen auf empirischer Basis die Effekte von Temperatur und Ionenstärke korrigiert werden.

2.4 Optische Eigenschaften von Molekülen und deren Detektion

2.4.1 Lichtextinktion

Die für die Proteinchromatographie wichtigste Messmethode zur Online-Prozessüberwachung ist die Messung der Extinktion (Synonym: Attenuation) monochromatischen Lichts in der Flüssigphase. Der Messlichtstrahl durchquert dabei ein orthogonal angeordnetes, transparentes Probengefäß und wird dabei relativ zum Referenzlichtstrahl abgeschwächt. Die Abnahme der Lichtintensität lässt sich durch das Gesetz nach *Lambert-Beer* in (36) beschreiben.

$$I = I_0 e^{-\varepsilon c l} \quad (36)$$

Demnach ist die gemessene Lichtintensität I um einen exponentiellen Faktor schwächer als die Intensität des Referenzlichtstrahls I_0 , der sich aus dem Produkt der Proteinkonzentration c , einem messsystemspezifischen Extinktionskoeffizienten ε und der Weglänge l des Messlichtstrahls in der Probe zusammensetzt. Die Extinktion der gemessenen Probe ist somit äquivalent zum logarithmierten Koeffizient der beiden Lichtintensitäten und dem Produkt der drei zuvor beschriebenen Größen proportional, dargestellt in (37).

$$E = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon c l \quad (37)$$

Mögliche Ursachen für eine gemessene Lichtextinktion sind:

- a) Absorption durch die gelösten Stoffe
- b) Ablenkung des Messlichtstrahls aus der Detektorebene durch Lichtbrechung, -beugung, -reflexion und -streuung.

Bei der Absorption von Licht durch Materie wird die Energie der elektromagnetischen Wellen in elektronische Anregungsenergie umgesetzt. Dabei muss die Energie eines Lichtquants den Gesetzen der Quantenmechanik zufolge

2 Theoretische Grundlagen

dem Betrag nach der Anregungsenergie für ein höheres elektronisches Energieniveau –inklusive Schwingungs- und Rotationsniveaus– entsprechen. Typischerweise besitzen Photonen aus dem Spektrum des sichtbaren und ultravioletten Lichts Energien in einer Größenordnung, die ausreichend ist, um π -Elektronen in unterschiedlichen Bindungsstrukturen in höhere Energieniveaus anzuregen. Da bei Raumtemperatur die Wärmeenergie allerdings zu niedrig ist, um angeregte Schwingungszustände zu besetzen, erfolgt die Absorption daher in der Regel aus dem niedrigsten Schwingungszustand. Das *Jablonski*-Diagramm ist die häufigste Darstellungsform für die Beschreibung der quantenoptischen Absorptions- und Emissionsvorgänge. Eine vereinfachte Version ist in Kapitel 2.4.2 dargestellt.

Die Absorptionseigenschaften von Proteinen werden ausschließlich durch die aromatischen Seitenketten der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin bestimmt sowie durch die Disulfidbrücke des Cystins [Edelhoch 1967; Gill et al. 1989; Pace et al. 1995]. *Pace et. al.* haben einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der drei genannten Komponenten und dem molaren Extinktionskoeffizienten bei 280nm gefunden, der in (38) dargestellt ist. Voraussetzung für die Gültigkeit dieses Zusammenhangs ist eine Molekülgröße von weniger als ca. 50 nm sowie das Vorhandensein mindestens eines Tryptophans und der Korrektur der Absorptionsspektren bezüglich potentiell vorhandener *Rayleigh-Streuung*, welche bei einer Wellenlänge von 330 nm gemessen wird. Die Korrekturfunktion ist in (39) dargestellt. Die Stärke der *Rayleigh-Streuung* ist umgekehrt proportional zu der vierten Potenz der Wellenlänge, nimmt also mit zunehmender Wellenlänge ab.

$$\epsilon_{M,280} = n_{\text{Trp}} \cdot 5500 + n_{\text{Tyr}} \cdot 1490 + n_{\text{Cys}} \cdot 125 \quad (38)$$

$$A_{280,\text{korrigiert}} = A_{280,\text{Messung}} - A_{330,\text{Messung}} \cdot 1,929 \quad (39)$$

Sämtliche andere Phänomene, welche eine Lichtextinktion bedingen und nicht auf Absorption und *Rayleigh-Streuung* zurückzuführen sind und unter Punkt (b) zuvor erwähnt wurden, lassen sich durch Messung einer Negativkontrolle bei 280 nm korrigieren. Bei dieser Negativkontrolle wird anstatt einer Proteinlösung lediglich der Lösungspuffer vermessen, der sonstige experimentelle Ansatz allerdings konstant gelassen.

2.4 Optische Eigenschaften von Molekülen und deren Detektion

2.4.2 Fluoreszenz

Bei Fluoreszenz handelt es sich generell um die Abgabe von Energie in Form von Strahlung, wobei die Energie der Emission typischerweise niedriger ist als die der Absorption. Eine Substanz strahlt somit Licht bei einer höheren Wellenlänge aus als die Absorptionswellenlänge, was als Stokessche Verschiebung bezeichnet wird. Eine weitere Eigenschaft der Fluoreszenz ist ein gleich bleibendes Emissionsspektrum unabhängig von der Anregungswellenlänge.

Der Fluoreszenzvorgang

Wie bereits in Kapitel 2.4.1 erwähnt lassen sich die Absorptions- und auch die Emissionsvorgänge durch ein *Jablonski-Diagramm* darstellen, welches in einer vereinfachten Version in **Bild 2.4** gezeigt ist.

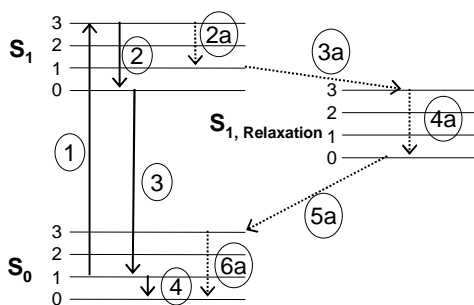


Bild 2.4: Vereinfachtes Jablonski Diagramm.

Schematisch dargestellt sind zwei elektronische Energieniveaus von zwei Elektronen im π -Orbital eines Fluorophors. Diese mit S_0 und S_1 bezeichneten Niveaus sind mit ihren jeweiligen Grundschwingungszuständen 0, bzw. angeregten Schwingungszuständen 1-3 dargestellt.

Beim normalen Fluoreszenzvorgang wird das Elektron von S_0 in ein höheres Schwingungsniveau von S_1 angeregt (Schritt 1), relaxiert daraufhin in den Grundschwingungszustand dieses Energieniveaus (Schritt 2) und fällt dann unter Abgabe des Fluoreszenzsignals in den Grundzustand S_0 zurück (Schritt 3). Die Beschreibung weiterer Vorgänge ist im Haupttext zu finden.

Eine π -Elektronenbindung besteht stets aus zwei Elektronen, was nach dem *Pauli-Prinzip* auch die maximale Anzahl an Elektronen darstellt, die π -Bindungorbitale besetzen können. Die Elektronen müssen zudem auch antiparallele Spins aufweisen. Diese nach *Pauli* erlaubten Zustände werden als Singulett-Zustände bezeichnet, die in dem *Jablonski-Diagramm* durch die mit S gekennzeichneten parallelen Linien dargestellt sind. Der Grundsingulett-Zustand wird als S_0

2 Theoretische Grundlagen

bezeichnet, der erste angeregte Zustand als S_1 . Zu jedem dieser Zustände existieren mehrere Schwingungsenergieniveaus, die mit 0, 1 oder 2 fortlaufend nummeriert sind. Nach der Lichtabsorption können mehrere verschiedene Prozesse ablaufen:

Eine fluoreszierende Substanz wird mit hoher Wahrscheinlichkeit in ein höheres Schwingungsniveau von S_1 (Nr. 1) angeregt und relaxiert daraufhin innerhalb von weniger als 10^{-12} s in das Schwingungsgrundniveau dieses elektronischen Energieniveaus (Nr. 2). Dieser Vorgang wird als Interne Umwandlung bezeichnet und verläuft schneller als die Emission, die mit einer mittleren Lebensdauer von 10^{-8} s im Allgemeinen vom Schwingungsgrundniveau von S_1 stattfindet und eine Rückkehr zum Grundzustand S_0 bedingt (Nr. 3, 4). Moleküle können auch über eine Spinumwandlung in den ersten Triplettzustand T_1 gelangen, ein nach dem *Pauli-Prinzip* verbotener Übergang der als Intersystem Crossing bezeichnet wird und eine als Phosphoreszenz bezeichnete Emission unter Spinumkehr von T_1 nach S_0 bedingt (nicht gezeigt). In selteneren Fällen kann auch eine durch Lösungsmittelrelaxation bedingte erneute Spinumkehr erfolgen, die das Elektron innerhalb von 10^{-12} s wieder auf das Schwingungsgrundniveau des S_1 Zustands bringt und zu verzögerter Fluoreszenz führt (Nr. 2a - 6a).

Konkurrierende Effekte

Die Qualität eines Fluorophors wird durch seine Quantenausbeute, das Mengenverhältnis aus absorbierten und emittierten Photonen, definiert. Die Quantenausbeute wird wiederum maßgeblich durch die Fluoreszenzlebensdauer bestimmt, die durchschnittliche Zeit, die eine Substanz im angeregten Zustand verbringt. Dies sind nach *Lakowicz* [Lakowicz 2006] durchschnittlich 10^{-9} s. Lösungsmiteleigenschaften, wie pH-Wert, Temperatur, Viskosität, Polarität und Ionenstärke beeinflussen das Ausmaß der Energierelaxation und somit die Fluoreszenzlebensdauer. Es existieren zudem weitere Prozesse, die die Fluoreszenzintensität einer Substanz verringern:

Beim Quenching verliert ein Fluorophor im angeregten Zustand einen Teil seiner Energie durch Kollisionen mit anderen Molekülen, die damit nicht mehr für die Emission von Photonen zur Verfügung steht. Beispiele für Quencher-Moleküle,

2.4 Optische Eigenschaften von Molekülen und deren Detektion

mit denen der angeregte Fluorophor zusammenstößt, sind z.B. Sauerstoff, Halogene oder Amine [Lakowicz 2006]. Durch den Inneren Filtereffekt wird sowohl Anregungs- als auch emittiertes Licht von den Fluorophoren oder anderen spezifisch absorbierenden Substanzen, die zwischen dem eigentlichen Anregungs- und Messpunkt lokalisiert sind, absorbiert. Durch diesen potentiell kumulativen Effekt reduziert sich die Signalintensität am Messpunkt.

Durch beide Effekte sind die gemessene Fluoreszenzintensität und die Substanzkonzentration nicht mehr linear proportional zueinander womit sich die Quantifizierung erschwert.

2.4.3 Konfokale Laser Raster Mikroskopie (CLSM)

Das konfokale Laser Raster Mikroskop (engl. Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM) erweitert die Funktionsweise eines gewöhnlichen Lichtmikroskops. Prinzipiell wird eine spezielle Fluoreszenzmessung durchgeführt, bei der die vermessene zweidimensionale Bildebene in horizontalen Inkrementen von weniger als 1 μm abgerastert wird. Das durch Laserlicht einer charakteristischen Wellenlänge angeregte Fluoreszenzsignal muss eine räumlich exakt passend angeordnete Lochblende passieren, die sämtliche Signale außerhalb der Fokusebene abblockt. Durch diese sogenannte konfokale Anordnung ist es möglich, innerhalb eines dreidimensionalen Raums einzelne horizontale Ebenen mit einer Scantiefe im Mikrometerbereich durch eine Art von „optischen Schnitten“ nicht invasiv zu analysieren.

Die CLSM wurde zuerst vor über 10 Jahren auf akademischer Seite für die direkte Analyse von proteinchromatographischen Systemen eingesetzt. Diese Untersuchungen konzentrierten sich hauptsächlich auf eine qualitativere Darstellung von intrapartikulären Transport- und Verdrängungsprozessen von Ein- bzw. Mehrkomponentensystemen. Ausgehend von manuell durchgeführten Finite Bath Experimenten fokussierten sich die Untersuchungen dabei fast ausschließlich auf Affinitäts- [Ljunglof et al. 1996] und Ionenaustauschersysteme [Ljunglof et al. 1998]. Eine methodische Erweiterung stellten Untersuchungen im gepackten Adsorbensbett dar, wo speziell an den Mikroskoptisch angepasste und optisch transparente Module mit gepackten Adsorbensbetten im Mikrolitermaßstab

2 Theoretische Grundlagen

verwendet wurden [Dziennik 2002; Hubbuch et al. 2002]. Im Folgenden wurden die mit der CLSM Analyse gewonnenen Beladungsprofile an ein Einzelpartikelmodell von *Susanto et. al.* angepasst, wie es in Kapitel 2.2.3 eingeführt wurde.

Der prinzipielle Strahlengang eines 1-Photonen-CLSM ist in **Bild 2.5** gezeigt.

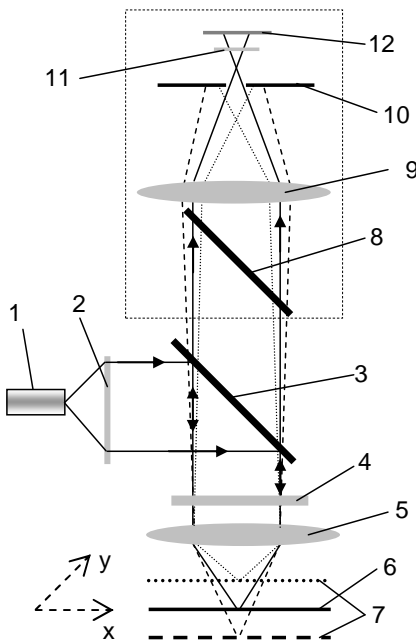


Bild 2.5: Schematische Darstellung des Strahlengangs in einem Konfokalen Laser Raster Mikroskop

Aus der Laserquelle (1) wird Licht mit diskreten Wellenlängen emittiert welches im Kollimator (2) parallelisiert wird. Der Hauptfarbteiler (3) reflektiert das Licht auf die x-y-Scaneinheit, durch die das Objekt in der Fokusebene (6) punktförmig abgerastert wird. Der Strahl wird durch das Objektiv (5) fokussiert. Das emittierte Fluoreszenzsignal kann aufgrund seiner höheren Wellenlänge den Hauptfarbteiler, einen dichroitischen Spiegel passieren und danach von mehreren weiteren Nebenfarteilern (8, nur einer gezeigt) spektral aufgespalten werden. Der durch eine weitere Linse (9) auf den Detektor (12) fokussierte Lichtstrahl muss zuvor eine Lochblende (10) passieren. Diese Lochblende, die konjugiert / konfokal zu der Fokusebene (6) angeordnet ist, blockt Strahlen welche von

Ebenen außerhalb der Fokusebene (7) entstammen. Zwischen Lochblende (10) und Detektor (12) ist zusätzlich ein Emissionsfilter (11) angeordnet, durch den unerwünschte Wellenlängenspektren herausgefiltert werden können.

Da diese konfokale Anordnung höhenverstellbar ist, ergibt sich somit die Möglichkeit, nicht-invasive „optische Schnitte“ an einer Probe vorzunehmen und diese schichtenweise zu analysieren. Diese Möglichkeit ist in **Bild 2.6** skizziert.

2.4 Optische Eigenschaften von Molekülen und deren Detektion

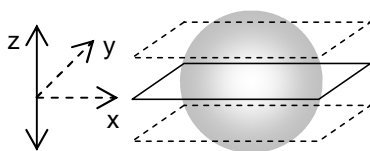


Bild 2.6: Schematische Darstellung der Lichtabschwächung und Partikelgeometrie

Im Fall der hier untersuchten sphärischen Asorbentien kann die Höhe der konfokalen Anordnung (die z-Koordinate) verändert werden

und somit „Stapel“ von x-y Scans aufgenommen werden.

Werden mehrere Fluorophore eingesetzt und somit mehrere Signale unterschiedlicher Wellenlänge und Intensität emittiert, so ist es möglich das Signal durch die vorhandenen Nebenfarbteiler und Emissionsfilter spektral aufzuspalten. Eine der drei Kaskaden aus Nebenfarbteiler, Lochblende, Emissionsfilter und Detektor ist in **Bild 2.5**, Nr. 8-12, gezeigt.

Modell der Lichtabschwächung

Zur Quantifizierung der in Kapitel 2.4.1 und 2.4.2 beschriebenen Phänomene wurde von *Susanto et. al.* [Susanto et al. 2006] ein vereinfachtes Modell der Lichtabschwächung entwickelt. Das Modell baut auf einer Arbeit von *Heinemann et. al.* [Heinemann et al. 2004] auf und wurde dahingehend modifiziert, dass nicht von einer homogenen Beladung des Partikels ausgegangen wurde und sowohl konzentrationsabhängige als auch –unabhängige Effekte als potentielle Ursachen für die Lichtabschwächung angenommen wurden. Die im Folgenden beschriebenen Annahmen sind in **Bild 2.7** schematisch dargestellt, wobei auch hier die in **Bild 2.6** eingeführte Benennung des Koordinatensystems beibehalten wird. Die variable Positionierung der konfokalen Anordnung erfolgt entlang der z-Koordinate, die x-y Scanebene liegt orthogonal dazu.

2 Theoretische Grundlagen

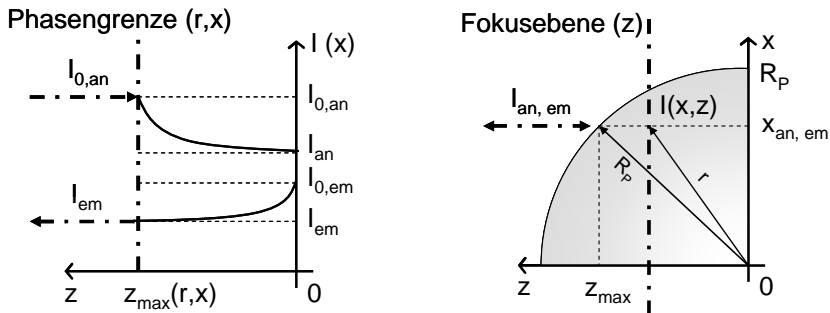


Bild 2.7: Schematische Darstellung der Lichtabschwächung und Partikelgeometrie.

Links: Schematische Darstellung der Lichtabschwächung entlang des Strahlengangs gemäß des *Lambert-Beert* Gesetzes. Die Anregungsintensität $I_{0,an}$ wird vom Partikelrand z_{\max} hin zur Partikelmitte 0 abgeschwächt und erreicht das fokussierte Fluorophor mit der abgeschwächten Intensität I_{an} . Bestimmt durch die Quantenausbeute des Fluorophors ergibt sich daraus die wiederum reduzierte Fluoreszenzintensität $I_{0,em}$ in der Fokusebene, die auf ihrem Strahlengang zurück zum Partikelrand zu der final detektierten Fluoreszenzintensität I_{em} abgeschwächt wird.

Rechts: Aufgrund der Kugelform der Partikel ist die Weglänge des Lichtstrahls und damit auch die Lichtabschwächung abhängig von der Position in der x,y-Ebene und damit nur für jedes Kreissegment des 2-dimensionalen Fluoreszenzintensitätsprofils gleich. Über die geometrische Beziehung nach *Pythagoras* lässt sich der Wert für z_{\max} aus der x-Koordinate des analysierten Profils und dem normierten Einheitsradius 1 errechnen, wie in (46) dargestellt.

Der konzentrationsunabhängige Effekt basiert auf den unterschiedlichen Brechungsindizes der Protein-Puffer-Lösung und der Adsorbensmatrix. Dieses für die CLSM-Analyse relevante optische Messartefakt fällt unter die Kategorie (b) der in der Einleitung in Kapitel 2.4 beschriebenen nicht-absorptionsbedingten Effekte, die eine Lichtextinktion bedingen. In diesem Fall kann das Messergebnis nicht um den Betrag einer einfachen Negativkontrolle wie bei reinen Absorptionsmessungen korrigiert werden. Beeinträchtigt werden bei diesem Abschwächungseffekt sowohl Hin- und Rückweg des Strahlengangs, d.h. sowohl das Anregungs- als auch das Emissionssignal. Die Stärke der Abschwächung ist unabhängig von der Fluorophorkonzentration in dem Adsorbens und direkt proportional der Weglänge durch die Adsorbensmatrix. Dieser konzentrationsunabhängige Effekt wird durch zwei Extinktionskoeffizienten, $\epsilon_{\text{Matrix, An}}$ für den Hinweg oder Anregungsstrahlengang sowie $\epsilon_{\text{Matrix, Em}}$ für den Rückweg oder Emissionsstrahlengang, beschrieben.

2.4 Optische Eigenschaften von Molekülen und deren Detektion

Der konzentrationsabhängige Effekt berücksichtigt zum einen die Tatsache, dass das Anregungssignal auf seinem Weg zu der Fokusebene auch Fluorophore außerhalb dieser Ebene anregen kann und somit abgeschwächt wird. Da das emittierte Fluoreszenzsignal außerhalb der Fokusebene durch die konfokal angeordnete Lochblende abgeblockt wird, ist das erhaltene Signal aus der Fokusebene schwächer als ideal angenommen. Da sich zudem die Absorptions- und Emissionsspektren eines Fluorophors überschneiden, kann auch von der Fokusebene emittiertes Licht durch Absorption von Fluorophoren außerhalb der Fokusebene abgeschwächt werden. Dieser konzentrationsabhängige Effekt wird durch zwei Extinktionskoeffizienten, $\epsilon_{\text{Fluorophor, An}}$ für den Hinweg oder Anregungsstrahlengang sowie $\epsilon_{\text{Fluorophor, Em}}$ für den Rückweg oder Emissionsstrahlengang, beschrieben.

Die *Lambert-Beer* Gleichung für die Lichtabschwächung entlang des Anregungsstrahlengangs ist in (41) gezeigt:

$$\frac{dI_{\text{An}}}{I_{\text{An}}} = -(\epsilon_{\text{Matrix, An}} + \epsilon_{\text{Fluorophor, An}} \times q) dz \quad (40)$$

$$I_{\text{An}}(z) = I_{0, \text{An}} \times \exp \left(-\epsilon_{\text{Matrix, An}} \times z - \epsilon_{\text{Fluorophor, An}} \times \int_0^z q(z) dz \right) \quad (41)$$

Die ursprünglich vom Laser ausgesendete Lichtintensität $I_{0, \text{An}}$ wird entlang der Weglänge z des Anregungsstrahlengangs abgeschwächt. Im Fall der konzentrationsabhängigen Lichtabschwächung ist diese an jedem Punkt auf der Weglänge der dort vorhandenen Konzentration an markiertem Protein q proportional. Die Gleichung für die Lichtabschwächung entlang des Emissionsstrahlengangs ist in Analogie dazu in (42) dargestellt:

$$I_{\text{Em}}(z) = I_{0, \text{Em}} \times \exp \left(-\epsilon_{\text{Matrix, Em}} \times z - \epsilon_{\text{Fluorophor, Em}} \times \int_0^z q(z) dz \right) \quad (42)$$

Unter Annahme einer konstanten Quantenausbeute Φ (vgl. Kap 0) ist die im Fokuspunkt emittierte Lichtintensität $I_{0, \text{Em}}$ der Konzentration an Fluorophor und der dortigen Anregungsintensität proportional wie in (43) beschrieben.

2 Theoretische Grundlagen

$$I_{0,Em}(z) = \Phi \times I_{An}(z) \times q(z) \quad (43)$$

Durch Kombination der (41) - (43) ergibt sich für die detektierte Fluoreszenzintensität $I_{Em}(z)$ gemäß (44):

$$I_{Em}(z) = I_{0,An} \times \Phi \times q(z) \times \exp \left(-\epsilon_{Matrix} \times z - \epsilon_{Fluorophor} \times \int_0^z q(z) dz \right) \quad (44)$$

Die jeweiligen konzentrations-abhängigen und -unabhängigen Extinktionskoeffizienten für den Anregungs- und Emissionsstrahlengang können jeweils zu einem Summenkoeffizienten für den Einfluss der Adsorbensmatrix ($\epsilon_{Matrix} = \epsilon_{Matrix, An} + \epsilon_{Matrix, Em}$) und einem für den Einfluss der (Re-)Absorption außerhalb der Fokusebene ($\epsilon_{Fluorophor} = \epsilon_{Fluorophor, An} + \epsilon_{Fluorophor, Em}$) zusammengefasst werden.

Aufgrund der kugelförmigen Gestalt der Adsorbentien ist die maximale Weglänge des Lichtstrahls z_{max} in Abhängigkeit von der Scan-Position in der x-Ebene unterschiedlich lang. Über den Satz des Pythagoras in (46) kann diese Größe aufgrund der bekannten Position in der x-Ebene und dem experimentell bestimmbaren Partikelradius R_p ermittelt werden wie in (45) gezeigt.

$$I_{Em}(x, z) = I_{0,An} \times \Phi \times q(x, z) \times \exp \dots \left(-\epsilon_{Matrix} \times (z_{max}(x) - z) - \epsilon_{Fluorophor} \times \int_0^{z_{max}(x)} q(x, z) dz \right) \quad (45)$$

$$z_{max}(x) = \sqrt{R_p^2 - x^2} \quad (46)$$

Um den Vergleich von Partikeln unterschiedlicher Radien zu ermöglichen, können die dimensionsbehafteten Größen in (45) durch dimensionslose Größen ersetzt werden. Mit (47) – (49)

2.4 Optische Eigenschaften von Molekülen und deren Detektion

$$\bar{x} = \frac{x}{R_p}; \bar{z} = \frac{z}{R_p}; \bar{r} = \frac{r}{R_p} = \sqrt{\bar{x}^2 + \bar{z}^2} \quad (47)$$

$$\bar{I}_{Em} = \frac{I_{Em}}{I_{0,An} \Phi q_{R_p}} = \frac{I_{Em}}{I_{Em,max}} \quad (48)$$

$$\bar{q}_r = \frac{q_r}{q_{R_p}} \quad (49)$$

lässt sich (45) und (46) in dimensionsloser Form zu (50) und (51) umformulieren.

$$\bar{I}_{Em}(\bar{x}, \bar{z}) = \bar{q}_r(\bar{x}, \bar{z}) \times \exp \dots \quad (50)$$

$$\dots \left(-\epsilon_{Matrix} \times R_p \times (\bar{z}_{max}(\bar{x}) - \bar{z}) - \epsilon_{Fluorophor} \times R_p \times q_{R_p} \times \int_{\bar{z}}^{\bar{z}_{max}(\bar{x})} \bar{q}_r(\bar{x}, \bar{z}) d\bar{z} \right)$$

$$\bar{z}_{max}(\bar{x}) = \sqrt{1 - \bar{x}^2} \quad (51)$$

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Die folgenden Angaben beschränken sich auf die Hauptcharakteristika der verwendeten Proteine, Fluorophore, Adsorbermaterialien und Puffer. In Kapitel 6.2 befindet sich eine Auflistung der verwendeten Geräte (Kap. 6.2.2) und Chemikalien (Kap. 0) sowie der Standorte der Hersteller (Kap. 6.2.1).

3.1.1 Proteine

Tabelle 3.1: Hauptcharakteristika der experimentell verwendeten Proteine

¹⁾ Molekularmasse (kDa≡Kilo-Dalton≡kg mol⁻¹), im Fall der beiden humanisierten Immunglobuline G bezieht sich die Molekularmasse auf die unglykosilierte Peptidsequenz; ²⁾ Isoelektrischer Punkt; ³⁾ Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank; ⁴⁾ Mol spezifischer Extinktionskoeffizient; ⁵⁾ Name des Herstellers: BM – Boehringer Mannheim.

Name	Abkür- zung	$m_m^{1)}$ [kDa]	$pI^{2)}$ [1]	PDB Datei ³⁾	$\epsilon_{M, 280}^{4)}$ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	Her- steller ⁵⁾
Rinderserum- albumin	BSA	67	4,7	1C1U	36500	Sigma
Lysozym	LYS	14	11,0	1AKI	39000	Sigma
Ovalbumin	OVA	45	5,1	1OVA	54300	Sigma
Concanavalin A	ConA	104	5,5	1SCS	486000	Sigma
Humanisiertes IgG 01	Mab01	157	8,42	n. v.	262400	BM
Humanisiertes IgG 02	Mab02	143	8,54	n. v.	212400	BM

3.1 Materialien

Die Bestimmung des mol-spezifischen Extinktionskoeffizienten erfolgte über im Fall von BSA, Lysozym, Ovalbumin und Concanavalin A durch die Aufnahme von Kalibriergeraden basierend auf Einwaage von lyophilisiertem Protein. Die daraus resultierenden Kalibriergeraden ergaben einen molaren Extinktionskoeffizienten, der in allen Fällen um weniger als 6% von den theoretisch ermittelten abwich (Daten nicht gezeigt, vgl. Kap. 2.4.1 bezüglich der theoretischen Extinktionskoeffizienten). Die verwendeten Lyophilisate hatten laut Herstellerangaben eine Reinheit von 95 % (m/m) - 99 % (m/m) und wurden ohne weitere Aufreinigungsschritte verwendet. Aufgrund der unbekannten chromatographischen Eigenschaften der Kontaminanten wurden die jeweiligen Lösungen als Einkomponentensysteme betrachtet und die experimentell ermittelten Koeffizienten verwendet.

Bei den beiden IgGs standen Aliquots der jeweiligen Stammlösungen zur Verfügung. Die Molekularmasse beider Proteine wurde pauschal mit 150 kDa angegeben, die Konzentration beider Stammlösungen wurden mit $4,7 \text{ mg ml}^{-1}$ für Mab01 und $5,2 \text{ mg ml}^{-1}$ für Mab02 angegeben. Ohne Berücksichtigung der Glykosylierung beider Proteine ist Mab01 allerdings schon deutlich schwerer als Mab02 mit einer Massendifferenz von ca. 15 kDa. Die Extinktionskoeffizienten, welche aus Kalibriergeraden unter Verwendung der angegebenen Konzentration der Stammlösungen und einer Molekularmasse von 150 kDa ermittelt wurden, wichen um 11%, bzw. 14% von den theoretisch errechneten ab (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Größe der Proteine und der ausreichend hohen Anzahl an Tryptophanen wurde der Algorithmus zur Bestimmung der Extinktionskoeffizienten aus deren primärer Aminosäuresequenz als zuverlässiger angesehen [Pace et al. 1995] und anstatt des experimentell ermittelten Extinktionskoeffizienten verwendet.

3.1.2 Fluorophore

Bei Benutzung eines 1-Photonen-Konfokalen Laser Raster Mikroskops ist eine Markierung der zu untersuchenden Proteine mit Fluorophoren notwendig. **Tabelle 3.2** zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Fluorophore und deren wesentliche Eigenschaften.

3 Material und Methoden

Tabelle 3.2: Hauptcharakteristika der experimentell verwendeten Fluorophore

¹⁾ Name des Fluorophors; ²⁾ Molekularmasse ($\text{Da} \equiv \text{Dalton} \equiv \text{g mol}^{-1}$); ³⁾ Wellenlänge des Anregungsmaximums des Fluorophors; ⁴⁾ Wellenlänge des Emissionsmaximums des Fluorophors; ⁵⁾ molarer Extinktionskoeffizient, für Fluorescein-Dextran keine Angabe möglich aufgrund der großen Bandbreite an Molekularmassen; 6) Korrekturfaktor: Quotient der Extinktion des Fluorophors bei 280 nm und dessen Absorptionsmaximum ⁷⁾ Name des Herstellers: GEHC – General Electrics Healthcare, MP – Molecular Partners.

Name ¹⁾	m_m ²⁾	$\lambda_{\text{Anregung}}$ ³⁾	$\lambda_{\text{Emission}}$ ⁴⁾	ϵ_M ⁵⁾	$F_{\text{Fluorophor, 280} / \lambda_{\text{max}}}$ ⁶⁾	Her- steller ⁷⁾
	[Da]	[nm]	[nm]	[$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]	[1]	
Cy 3	766	548	561	150000	0,08	GE HC
Cy 5	792	646	664	250000	0,05	GE HC
Alexa 488	643	495	519	71000	0,11	Invitro- gen
Bodipy FL	389	503	512	82000	0,04	MP
Fluorescein-Dextran	varia- bel	494	518	k.A.	0,30	MP

Das für diese Arbeit wichtigste Fluorophor, Cy5, ist ein Cyanin-Farbstoff und entstammt der „Cy Dye“® Produktfamilie der Fa. General Electrics Healthcare. Die Leitstruktur dieser Farbstofffamilie besteht aus der spiegelsymmetrischen Anordnung zweier heterozyklischer Nonamere, die über eine variable Anzahl von Ethylen-Einheiten miteinander verbunden sind und jeweils eine unterschiedliche Restgruppe aufweisen können (vgl. **Bild 3.1**).

3.1 Materialien

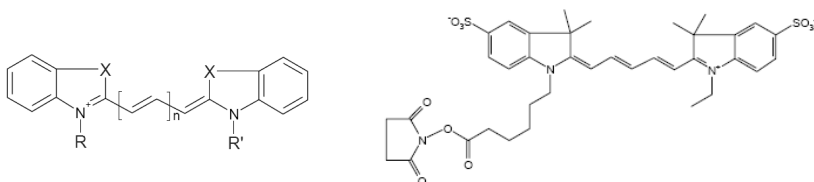


Bild 3.1: Leitstruktur der Cy Farbstofffamilie und vollständige Struktur von Cy5.

Links: Leitstruktur der gesamten Farbstofffamilie. Zwei spiegelsymmetrische angeordnete Nonamer-Heterozyklen sind über eine variable Anzahl von Ethylen-Einheiten miteinander verbunden. X:O, NR, C(CH₃)₂, S, Se; R, R': Alkyl oder Aryl; n=0-5. Rechts: Struktur von Cy5 inkl. reaktiver Succinimidylgruppe (unten links), die mit dem Carboxyl-C-Atom verestert ist.

Die beiden weiteren Fluorophore, Alexa 488 und Bodipy FL wurden als Referenz in den chromatographischen Experimenten zur Charakterisierung des Systems bzgl. Ein- oder Zwei-Komponenten-Verhalten verwendet. Ihre Struktur ist in **Bild 3.2** gezeigt.

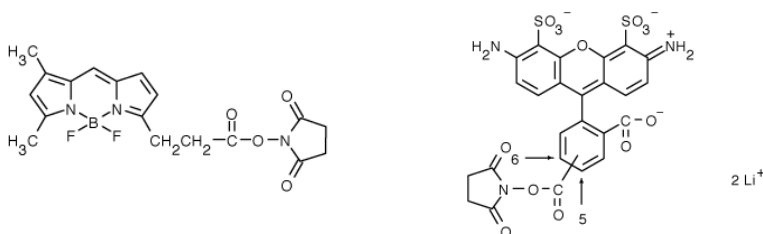


Bild 3.2: Struktur der beiden Fluorophore Bodipy FL und Alexa Fluor 488

Links: Struktur des Fluorophors Bodipy FL inkl. reaktiver Succinimidylgruppe (unten rechts), die mit dem Carboxyl-C-Atom verestert ist (Fa. Molecular Partners). Das kleine sehr kompakte Molekül ist das hydrophobste der in dieser Arbeit verwendeten Fluorophore. Rechts: Struktur von Alexa Fluor 488 inkl. reaktiver Succinimidylgruppe (unten links), die über eine Estergruppe mit dem Carboxyl-C-Atom kovalent verbunden ist.

Die in **Tabelle 3.2** aufgelisteten molaren Extinktionskoeffizienten beziehen sich auf den linearen Bereich der Fluorophore von 0,2 bis 0,8 AU cm⁻¹. In Analogie zu den Protein-Kalibriergeraden in Kapitel 3.1.1 wurden für die beiden Fluorophore Cy3 und Cy5 analoge Messungen durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

3 Material und Methoden

3.1.3 Adsorbentien

Tabelle 3.3: Verwendete Adsorbentien

¹⁾ In dieser Arbeit verwendete Abkürzung; ²⁾ Zugrunde liegendes Trennprinzip: GA – Größenausschluss, HI – Hydrophobe Interaktion; RP – Reverse Phase, IA – Ionenaustausch Rückgratmaterial: FF – Fast Flow ³⁾ Partikeldurchmesser ⁴⁾ Mittlerer Partikeldurchmesser ⁵⁾ Porendurchmesser ⁶⁾ Mittlerer Porendurchmesser ⁷⁾ Ligandentyp ⁸⁾ Ligandendichte (basierend auf Herstellerangaben), k.A. – keine Angabe ⁹⁾ Hersteller: GE HC – General Electric Healthcare; MN – Macherey & Nagel.

Ab- kür- zung ¹⁾	Trenn- prin- zip ²⁾	Rück- grat ³⁾	d _{par- tikel} ⁴⁾ [μm]	D _{Pore} ⁵⁾ [nm]	Li- gand ⁷⁾	LD ⁸⁾ [μmol ml ⁻¹]	Her- steller ⁹⁾
-	GA	Sephadex G25	50	-	-	-	GE HC
-	GA	Sephadex G10	50	-	-	-	GE HC
BU	HI	Sepharose 4 FF	90 ⁴⁾	30 ⁶⁾	Butyl	50	GE HC
OC	HI	Sepharose 4 FF	90 ⁴⁾	30 ⁶⁾	Octyl	5	GE HC
PH	HI	Sepharose 6 FF	90 ⁴⁾	30 ⁶⁾	Phenyl	20	GE HC
PL	HI	Sepharose 6 FF	90 ⁴⁾	30 ⁶⁾	Phenyl	40	GE HC
-	RP	Nucleosil	5	10	C-18	k.A.	MN
-	RP	Nucleosil	5	50	C-18	k.A.	MN
SP	IA	Sepharose 4 FF	90 ⁴⁾	30 ⁶⁾	SP	210	GE HC

3.1.4 Puffersysteme

In **Tabelle 3.4** sind sämtliche Puffer dargestellt, die für die Niedrigdruckchromatographie sowie für die Finite Bath Experimente, die

3.1 Materialien

Miniatursäulenexperimente sowie die Löslichkeitsexperimente verwendet wurden. Die Puffer für die Hochdruckchromatographie sind in Kapitel 3.2.2 dargestellt.

Tabelle 3.4: Verwendete Puffer für die Niedrigdruckchromatographie sowie die Finite Bath, Löslichkeits- und In-Situ Markierungs-Experimente.

¹⁾ Bezeichnung des Puffersystems im weiteren Verlauf der Arbeit. ²⁾ Im Fall der Phosphatpuffer wurde ausschließlich die di-basische Form des entsprechenden Puffersalzes verwendet, der pH-Wert von 7,0 wurde mit Phosphorsäure (H_3PO_4) eingestellt. Im Fall der Citratpuffer wurde ausschließlich die tri-basische Form des Puffersalzes verwendet, der pH-Wert von 4,5 wurde mit Zitronensäure ($\text{C}(\text{COOH})\text{OH}(\text{COOH})_2$) eingestellt. Im Fall des Ammoniumacetats wurde der pH-Wert von 4,5 mit Essigsäure (CH_3COOH) eingestellt. Das in Lösung vorliegende Mengenverhältnis der Pufferionen ($\text{HPO}_4^{2-} / \text{H}_2\text{PO}_4^-$; $[\text{C}(\text{COO})\text{OH}(\text{COO})_2]^{3-} / [\text{C}(\text{COOH})\text{OH}(\text{COO})_2]^{2-}$; $\text{CH}_3\text{COO}^- / \text{CH}_3\text{COOH}$) wird durch das Dissoziationsgleichgewicht bei der entsprechenden Ionenstärke und Temperatur bestimmt. ³⁾ Mengenkonzentration an Puffersalz. ⁴⁾ Art des Lösungsmittel-Modifikators; kosmotrope Agenzien verschiedener Stärke; im Fall der Citrat- und Acetatpuffer sind Puffer- und Modifikatorsalz identisch. ⁵⁾ Mengenkonzentration des Lösungsmittel-Modifikators. ⁶⁾ Diese Konzentrationen wurden nicht für die Studien mit den beiden Antikörpern Mab01 und Mab02 verwendet.

Bezeichnung ¹⁾	Puffersalz ²⁾	c_p ³⁾ [mM]	pH ²⁾	Modifikator ⁴⁾	c_{Mod} ⁵⁾ [mM]
AS0350	K_2HPO_4	100	7,0	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	350
AS0700	K_2HPO_4	100	7,0	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	700
AS1000	K_2HPO_4	100	7,0	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1000 ⁶⁾
AS1500	K_2HPO_4	100	7,0	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1500 ⁶⁾
AS2000	K_2HPO_4	100	7,0	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2000 ⁶⁾
NC1250	Na_2HPO_4	20	7,0	NaCl	1250
NC2500	Na_2HPO_4	20	7,0	NaCl	2500
NC3750	Na_2HPO_4	20	7,0	NaCl	3750
NC5000	Na_2HPO_4	20	7,0	NaCl	5000
KCit0100	$\text{K}_3\text{C}(\text{CO}_2)\text{OH}(\text{CH}_2\text{CO}_2)_2$		4,5	s. Puffersalz	100
KCit0500	$\text{K}_3\text{C}(\text{CO}_2)\text{OH}(\text{CH}_2\text{CO}_2)_2$		4,5	s. Puffersalz	500
NCit0100	$\text{Na}_3\text{C}(\text{CO}_2)\text{OH}(\text{CH}_2\text{CO}_2)_2$		4,5	s. Puffersalz	100
NCit0500	$\text{Na}_3\text{C}(\text{CO}_2)\text{OH}(\text{CH}_2\text{CO}_2)_2$		4,5	s. Puffersalz	500
KAc1000	$\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$		4,5	s. Puffersalz	1000
KAc2500	$\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$		4,5	s. Puffersalz	2500
KAc5000	$\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$		4,5	s. Puffersalz	5000

3.2 Experimentelle Methoden

Die Darstellung der experimentellen Methode erfolgt in drei Themenblöcken: Die für die CLSM Analyse notwendige Probenvorbereitung ist in Kapitel 3.2.1 beschrieben. Die hauptsächlich für die Charakterisierung der vorbereiteten Proben verwendeten Säulenpulsexperimente ist in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Die Erstellung absoluter Konzentrationsprofile sollte über Miniatursäulen-Experimente erfolgen, die in Kapitel 3.2.3 beschrieben sind. Die Finite Bath Experimente und deren Abwandlungen sind schließlich in Kapitel 3.2.4 dargestellt.

3.2.1 Probenvorbereitung

Für die CLSM-Analyse mit einem 1-Photonenmikroskop ist eine Markierung der zu untersuchenden Proteine mit Fluorophoren notwendig. Die eingesetzten Proben wurden anhand folgender Kriterien hergestellt:

- Gesamte Proteinkonzentration und Konzentrationsverhältnis zwischen Fluorophor- und Gesamte Proteinkonzentration (D/P)
- Konzentration an Puffersalz und an kosmotropem Agens sowie der pH-Wert des Puffers bei Raumtemperatur

Die Probenherstellung anhand dieser Parameter erfolgte durch Anwendung einer Kombination folgender experimenteller Methoden, die in **Bild 3.3** dargestellt sind:

- Umpufferung und Aufreinigung mittels einer Größenausschlusschromatographiesäule
- Aufkonzentrierung mittels eines Ultrafiltrationsmoduls
- Markierung von Proteinen mit Fluorophoren

3.2 Experimentelle Methoden

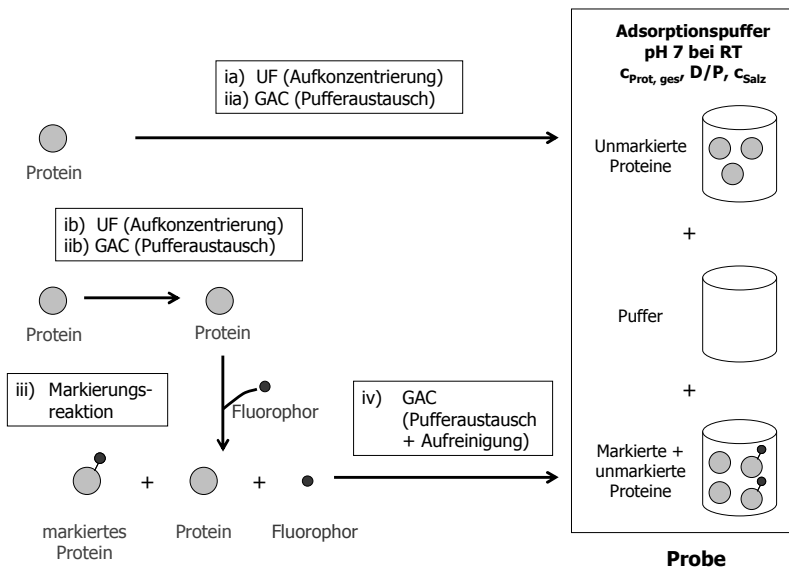


Bild 3.3: Schematische Darstellung der Probenvorbereitung für HIC-Adsorptionsexperimente.

Herstellung einer Probe für HIC-Adsorptionsexperimente: Die angestrebte Proteingesamtkonzentration ($c_{\text{Prot, ges}}$) und das Konzentrationsverhältnis aus Fluorophor und Gesamtprotein (D/P) wurden durch Vereinigung und Verdünnung der entsprechenden höher konzentrierten Stammlösungen in / mit Adsorptionspuffer eingestellt. Hauptmerkmal des Adsorptionspuffers ist die zu untersuchende Konzentration an kosmotropem Agens (c_{Salz}). Die Pufferaustauschschritte wurden mittels Größenausschlusschromatographie (GAC, Schritt (ii) und (iv)) durchgeführt. Die Aufkonzentrierung der Proteine erfolgte mittels Ultrafiltration (UF, Schritt (i)).

Markierung von Proteinen mit Fluorophoren

Die kovalente Bindung der Fluorophore an die Proteine (s. **Bild 3.3**, Schritt (iii)) erfolgte in allen Fällen über eine Amidbindung zwischen dem Carboxyl-C-Atom der Fluorophore und den primären Amingruppen der Proteine. Der nukleophile Angriff der freien N-Elektronenpaare wird durch eine Succinimidylgruppe ermöglicht, die mit der Carboxylgruppe des Fluorophors verestert ist und bei der Reaktion mit der primären Amingruppe des Proteins abgespalten wird. Ein Protein besitzt primäre Amingruppen in Form von ϵ -Aminogruppen der Lysin-Seitenketten sowie der endständigen Amingruppe einer Polypeptidkette. Der

3 Material und Methoden

Protonierungsgrad der Amingruppen, der von dem pH-Wert des in der Markierungsreaktion verwendeten Puffers abhängig ist, beeinflusst die Wahl des Bindungspartners. Bei neutralem pH-Wert fungieren hauptsächlich die endständigen Amingruppen als Edukte für die Amidbindung, bei basischerem pH-Wert hauptsächlich die ϵ -Amingruppen der Lysinseitenketten.

Für die Markierungsreaktionen in einem 0,1 M NaCO_3 Puffer mit einem eingestelltem pH-Wert von 8,5 – 9 wurden Aliquots von 0,2mg Fluorophor verwendet, was im Fall von Cy5 mit einer Molekularmasse der Esterverbindung von 766 Da einer Menge von ca. $2,6 \times 10^{-7}$ mol entspricht. Dieser Menge an Fluorophoren wurden ca. 15 mg BSA, bzw. 30 mg Antikörper zugegeben, was einer Menge von ca. 2×10^{-7} mol und einem Überschuss an Fluorophoren von ca. 1,3 : 1 entspricht. Die Konzentration an Gesamtprotein sowie an Fluorophor wurden photometrisch bestimmt, der Quotient beider Werte, der D/P-Wert, wurde als maßgebliches Charakteristikum der Lösung anhand von (52) ermittelt.

$$D/P = \frac{c_{n, \text{Fluorophor}}}{c_{n, \text{Protein, gesamt}}} = \frac{\epsilon_{M, \text{Protein}} (A_{\lambda \text{ max, Fluorophor}} - A_{280, \text{Fluorophor}} \times f_{280 / \lambda \text{ max, Fluorophor}})}{\epsilon_{M, \text{Fluorophor}} \times A_{280, \text{Protein}}} \quad (52)$$

Die Absorption (A) beider Molekülspezies bei ihrem jeweiligen Absorptionsmaximum ($\lambda \text{ max}$, 280 nm) gibt nicht direkt Aufschluss über deren Konzentration, das sich bei allen Messungen stets um ein Gemisch beider Spezies handelt und die Fluorophore ebenfalls signifikante Absorption bei 280 nm aufweisen. Dies kann durch einen Korrekturfaktor ($f_{280 / \lambda \text{ max, Fluorophor}}$) berücksichtigt werden. Da sich die Absorptionsmaxima aller Fluorophore jenseits von 500 nm befinden, ist die Absorption von Proteinen bei diesen Wellenlängen vernachlässigbar. Der Einfluss der Inkubationsdauer wurde durch Variation derselben und anschließendem Vergleich der Bandenflächen in den ÄKTA-Chromatogrammen untersucht (Daten nicht gezeigt). Die Markierungsreaktion war nach weniger als 2 min beendet, was der minimalen Experimentdauer entspricht und den Herstellerangaben von 1 h widerspricht. Der D/P-Wert der Proteinstammlösung resultierend aus dem GAC-Schritt (iv) in **Bild 3.3** betrug 0,2 – 0,7, der finale D/P-Wert der Proteinproben betrug 0,06 – 0,08.

3.2 Experimentelle Methoden

Herstellung der Proteinlösungen

Die für die Adsorptionsstudien hergestellten Proteinlösungen wurden für die jeweilige Pufferart und Salzstärke jeweils aus drei Lösungen hergestellt: Zwei Proteinstammlösungen in dem jeweiligen Puffersystem, eine mit unmarkiertem Protein und eine mit einer Mischung aus markiertem und unmarkiertem Protein sowie der jeweils verwendeten Pufferlösung.

Für die Herstellung der Proteinstammlösungen mit unmarkierten Proteinen fand für jeweils 50ml Aliquots beider Antikörper ein Pufferaustausch statt (s. **Bild 3.3**, Schritt (ia)), bei dem die Proteine von ihren Lagerungspuffern, einem Natrium-Citratpuffer und einem Glycin-Phosphatpuffer mit einem pH von 4,5 – 5, in das zu untersuchende Puffersystem mittels Größenausschlusschromatographie (GAC) überführt wurden. Verwendet wurde eine XK 26/50 Säule mit 500ml Säulenvolumen, die nach dem Säulenlauf aufgefangene Säulenfraktion hatte ein Volumen von 120-150ml und die Proteinlösung einen Verdünnungsfaktor von 2,5 -3. Für die Proteinstammlösung wurde eine Konzentration von 3 – 8 mg ml⁻¹ benötigt, die Ausgangskonzentration der beiden Antikörper lag bei 4 – 6 mg ml⁻¹. Die erforderliche Aufkonzentrierung der Antikörperlösungen erfolgte mittels eines Ultrafiltrationsmoduls der Fa. Amicon vor dem Pufferaustausch, um die Scheerbelastung der Proteine und verstärktes Fouling auf der Filtrationsmembran bei hohen Salzkonzentrationen zu vermeiden.

Für die Herstellung der Proteinstammlösungen bestehend aus einem Gemisch aus markierten und unmarkierten Proteinen hatte in einem ersten Schritt eine Markierungsreaktion mit Fluorophoren (s. **Bild 3.3**, Schritt (iii), vgl. Kap. 3.2.1) zu erfolgen, für die eine Proteinkonzentration von 12 – 15 mg ml⁻¹ benötigt wurde. Der GAC-Schritt wurde mittels einer XK 16/20 Säule mit 30 ml Säulenvolumen durchgeführt, die finalen Stammlösungen hatten eine Gesamtproteinkonzentration von 1,5 – 5 mg ml⁻¹.

Für die Herstellung der BSA Stammlösungen war keine Umpufferung notwendig, da das Lyophilisat direkt in dem jeweiligen Puffer aufgelöst werden konnte.

3 Material und Methoden

3.2.2 Experimente im Säulenmodus

Für die Pulsretentionsexperimente wurden zwei chromatographische Anlagen, ein Hewlett Packard 1090 HPLC-System für Hochdruckchromatographie sowie ein ÄKTA Basic 10-System für die Niederdruckchromatographie angewendet. Der prinzipielle Aufbau beider Anlagen ist gleich und in **Bild 3.4** dargestellt.

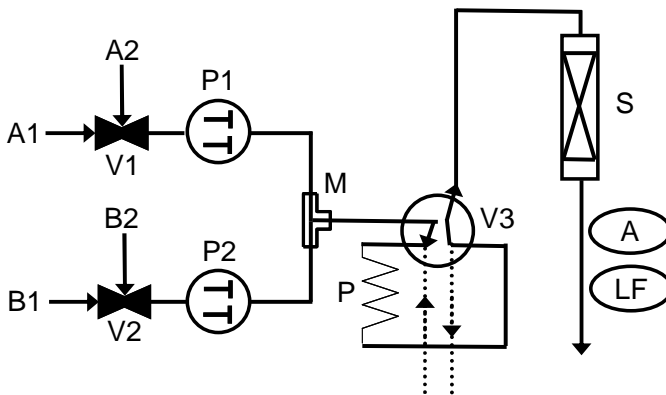


Bild 3.4: Skizze der verwendeten Chromatographieranlagen.

Zwei Doppelhubkolbenpumpen (P1, P2) saugen die Laufmittel aus den Behältern A1 / A2 und B1 / B2; zwischen den beiden Behältern 1 und 2 der jeweiligen Linie selektieren die beiden Pufferventile (V1, V2). Die Flüssigkeitsströme werden in der Mischkammer (M) vereinigt und durch das Probenventil (V3) durch die Säule (S) gepumpt. Die Probenschleife (P) wird separat mit der zu ladenden Probe gefüllt und anschließend durch eine Umschaltung des Probenventils (V3) in den Hauptstrom des Systems geschaltet. Am Säulenausgang wird die Absorption (A) und Leitfähigkeit (LF) in Echtzeit gemessen.

Durch die am Säulenausgang online gemessenen Absorptionssignale werden Banden erhalten, die bezüglich ihres Retentionsvolumens und ihrer Bandenfläche verglichen werden können. Der Vergleich ist dann möglich, wenn zwischen der Proteinkonzentration in der Detektorzelle und dem Absorptionssignal ein eindeutig definierter funktionaler Zusammenhang besteht, der innerhalb eines gewissen Konzentrationsbereiches gegeben ist und nicht zwangsläufig linear sein muss. Aus dem Retentionsvolumen (V_r), dem benötigten Laufmittelvolumen bis zum Erreichen eines Absorptionsmaximums, kann der dimensionslose Retentionsfaktor (k') bei Kenntnis des Totvolumens (V_t) der

3.2 Experimentelle Methoden

Chromatographieanlage sowie dem Retentionsvolumen unter nicht adsorbierenden Bedingungen (V_0) des Säulenmaterials errechnet werden.

$$k' = \frac{V_r - V_0 - V_t}{V_0 - V_t}$$

(53)

Die Fläche einer Bande wird nach (54) integriert.

$$PF_{A(\lambda)} = \int_{V_{\text{Peak-Ende}}}^{V_{\text{Peak-Anfang}}} A(\lambda) dV$$

(54)

RP-HPLC Pulsexperimente

Bei der HPLC Anlage 1090 von Hewlett Packard ist an das Probenventil (**Bild 3.4**, V3) eine Vorrichtung zur automatischen Probenaufgabe angeschlossen, bei dem die Probenflüssigkeit aus kleinen Probenröhrchen in die Probenschleife (P) gefüllt wird. Durch Umschalten des Probenventils (V3) wird die Probenschleife dann in den Hauptstrom der Anlage geschaltet und die Probe durch die Hauptpumpen (P1, P2) auf die Säule (S) befördert. Als Säule wurde eine EC 250/2 Säule verwendet, die mit Nucleosil 500-5 C-18 PPN (Proteine, Peptide, Nukleinsäuren) Material gepackt war. Dieses Material besteht aus Silika-Partikeln mit einem Partikeldurchmesser von 5 µm und einem Porendurchmesser von 500 Å, d. h. 50 nm. Die Oberfläche dieses Materials ist mit Octadecyl-Ketten (C-18-Ketten) funktionalisiert. Die verwendeten Laufmittel sind in **Tabelle 3.5** aufgelistet.

Tabelle 3.5: Für die analytische Reverse Phase HPLC verwendete Laufmittel

¹⁾ Volumenanteil ²⁾ Lösungsmittel-Modifikator, chaotropes Agens

Lösungsmittel	$x_{vol}^{1)}$ [%(v/v)]	Modifikator ²⁾	$x_{vol}^{1)}$ [%(v/v)]
H ₂ O	99,90	Trifluoressigsäure	0,10
CH ₃ CN	99,92	Trifluoressigsäure	0,08

3 Material und Methoden

Für alle zu untersuchenden Proben wurde das in **Tabelle 3.5** dargestellte Protokoll befolgt.

Tabelle 3.5: Protokoll der RP-HPLC Pulsexperimente

Verwendete Säule: EC 250/2, Säulenvolumen: 0,79 ml, gepackt mit Nucleosil 500-5 C-18 PPN; Laufmittel A: H₂O, 0,1%(v/v) Trifluoressigsäure (TFA); Laufmittel B: CH₃CN, 0,08%(v/v) Trifluoressigsäure (TFA) ¹⁾ Zeitpunkt, bzw. ²⁾ integrales Laufmittelvolumen einer bestimmten Parametereinstellung, bzw. Änderung derselben; ³⁾ Eingestellte Flussrate an beiden Hauptpumpen; ⁴⁾ Prozentualer Volumenanteil an Laufmittel A: H₂O, 0,1%(v/v) TFA; ⁵⁾ Prozentualer Volumenanteil an Laufmittel B: CH₃CN, 0,08%(v/v) TFA

Zeit ¹⁾ [min]	Volumen ²⁾ [ml]	Flussrate ³⁾ [ml / min]	X _{Vol} , Laufmittel A ⁴⁾ [% (v/v)]	X _{Vol} , Laufmittel B ⁵⁾ [% (v/v)]
-10	0	0,50	100	0
0 – 40	5 - 15	0,25	100 - 40	0 - 60
40	15	0,25	40	60
50	17,5	0,50	0	100
60	22,5	0	0	0

Das Injektionsvolumen pro Säulenlauf betrug stets 500 µl einer Proteinlösung mit innerhalb definierter Grenzen möglichst konstanter Gesamtproteinkonzentration. In **Tabelle 3.6** sind die jeweils verwendeten Konzentrationen und aufgegebenen Proteinmengen aufgelistet. Der D/P-Gehalt der verwendeten Lösungen lag stets bei 0,06 – 0,08.

Tabelle 3.6: Konzentrationsbereiche der Protein-Stammlösungen und aufzugebene Mengen an markierten und unmarkierten Proteinen für die RP-HPLC und HI-FPLC Pulsexperimente

¹⁾ Verwendete Proteine: BSA – Rinderserumalbumin, Mab02 – Monoklonaler Antikörper Nr. 2, vgl. **Tabelle 3.1**; ²⁾ Injektionsvolumina; ³⁾ Konzentrationsbereiche der Protein-Stammlösungen; ⁴⁾ Mengenbereich an aufgegebenen unmarkierten Proteinen; ⁵⁾ Mengenbereich an aufgegebenen markierten Proteinen

Protein ¹⁾	V _{Injektion} ²⁾ [µl]	c _{Stammlösung} ³⁾ [mg / ml]	n _{gesamt} ⁴⁾ [mg]	n _{markiert} ⁵⁾ [µg]
BSA	100	50 - 52	5 – 5,2	300 - 416
Mab02	100	25 - 27	2,5 – 2,7	150 - 216

3.2 Experimentelle Methoden

Mit Hilfe des Dioden Reihen Detektors (engl. DAD: Diode Array Detector) wurde die Absorption der Flüssigphase am Säulenausgang bei 215 nm, 280 nm und dem Absorptionsmaximum des jeweils verwendeten Fluorophors gemessen.

HI-FPLC Pulsexperimente

Bei der FPLC Anlage von GE Healthcare erfolgte die Befüllung der Probenschleife (**Bild 3.4**, P) manuell. Anstatt einer einzigen Säule wie im Fall der HPLC Anlage wurden 4 HR 5/5 Säulen von GE Healthcare parallel an einen Säulenbaum, bestehend aus zwei 8-Wege Ventilen an Position S in **Bild 3.4**, angeschlossen. Durch synchrone Anwahl einer Ventilposition kann dann eine spezifische Säule in den Hauptstrom der Anlage geschaltet werden. Zudem verfügt die Anlage über ein weiteres 8-Wege-Ventil, welches vor das Pumpenansaugventil A1 geschaltet ist und somit den Anschluss von bis zu acht verschiedenen Puffern an diesen Pumpeneingang ermöglicht. Der Anschluss der verschiedenen Puffer erfolgte nach dem in **Tabelle 3.7** dargestellten Schema.

Tabelle 3.7: Liste der für die FPLC Pulsretentionsexperimente angeschlossenen Puffer.

¹⁾ Die FPLC-Anlage ist mit zwei Doppelhubkolbenpumpen (A und B) versehen, die jeweils über zwei Eingänge (1 und 2) verfügen. Vor den Pumpeneingang A1 ist ein 8-Wegeventil geschaltet, wovon in diesem Versuchsaufbau sieben Eingänge (A11 – A17) verwendet wurden. ²⁾ Sämtliche Phosphat Puffer (A11 – A17) wurden mit der di-basischen Form des entsprechenden Puffersalzes hergestellt und mittels Phosphorsäure (H_3PO_4) auf einen pH-Wert von 7 bei 25 °C eingestellt; die Bezeichnung „ NaPO_4 “, bzw. „ KPO_4 “ bezieht sich auf das für diesen pH-Wert spezifische Dissoziationsgleichgewicht von NaH_2PO_4 und Na_2HPO_4 , bzw. KH_2PO_4 und K_2HPO_4 .

Pumpeneingang ¹⁾	Puffer ²⁾
A11	0,02 M „ NaPO_4 “
A12	0,02 M „ NaPO_4 “; 0,25 M NaCl
A13	0,02 M „ NaPO_4 “; 0,50 M NaCl
A14	0,02 M „ NaPO_4 “; 1,00 M NaCl
A15	0,1 M „ KPO_4 “
A16	0,1 M „ KPO_4 “; 0,35 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
A17	0,1 M „ KPO_4 “; 0,70 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
A2	Milli-Q H_2O
B1	1 M NaCl; 1 M NaOH

3 Material und Methoden

Pumpeneingang ¹⁾	Puffer ²⁾
B2	30 % (v/v) 2-Propanol

Die Pulsretentionsexperimente wurden unter isokratischen Bedingungen mit jeweils einem Puffertyp und mit sowohl unmarkierten Proteinen als auch einer Mischung aus markierten und unmarkierten Proteinen durchgeführt. Das Injektionsvolumen pro Säulenlauf betrug 500 µl einer Proteinlösung mit variablen Proteingesamtkonzentrationen. **Tabelle 3.6** enthält eine Liste der verwendeten Konzentrationen und aufgegebenen Mengen an markierten und unmarkierten Proteinen, in **Tabelle 3.8** ist das verwendete Protokoll dargestellt.

Tabelle 3.8: Protokoll der FPLC-Pulseexperimente

Verwendete Säulen: HR 5/5, Säulenvolumen: 1ml, gepackt mit Butyl-Sepharose FF, Octyl-Sepharose FF, Phenyl-Sepharose FF low / high sub (niedrige / hohe Ligandendichte); Laufmittel: siehe **Tabelle 3.3**; ¹⁾ Zeitpunkt, bzw. ²⁾ integrales Laufmittelvolumen einer bestimmten Parametereinstellung, bzw. Änderung derselben; ³⁾ Eingestellte Flussrate an beiden Hauptpumpen; ⁴⁾ Position des Eingangsventils an beiden Pumpen, eine Liste der angeschlossenen Puffer ist in **Tabelle 3.7** dargestellt ⁵⁾ Prozentualer Volumenanteil des beförderten Volumenstroms von Pumpe A, bzw. B; ⁶⁾ Das absolute Volumen der Adsorptionspufferzugabe nach Pulsinjektion wurde für alle drei verwendeten Proteine BSA, Mab01 und Mab02 für die Puffer an den Pumpeneingängen A11, A12 und A14 variiert ebenso wie die Flussrate. Dabei wurde jede Einstellung bei dem Volumen mit jeder Einstellung bei der Flussrate kombiniert.

Volumen ²⁾ [ml]	Flussrate ³⁾ [ml / min]	Ventil Pumpe A ⁴⁾	x_{Vol, A} [% (v/v)] ⁵⁾	Ventil Pumpe B ⁴⁾	x_{Vol, B} [% (v/v)] ⁵⁾
-5	0,8	A1x	100	B1	0
0	0,4 (0,7; 1,0) ⁶⁾	A1x	100	B1	0
10 (20, 50) ⁶⁾	0,4	A2	100	B1	0
15	0,4	A1	0	B1	100
20	0,4	A2	100	B1	0
25-30	0,4	A2	100 - 0	B2	0 - 100
30	0		0		0

3.2 Experimentelle Methoden

Mit Hilfe eines Diodenfeld Detektors wurde die Absorption der Flüssigphase am Säulenausgang bei 215nm, 280nm und dem Absorptionsmaximum des jeweils verwendeten Fluorophors gemessen.

Für diese Studien wurden drei Proteine, Rinderserumalbumin (BSA), Humanisierter Antikörper 1 & 2 (Mab 01 & 02) verwendet. Da sich zwischen dem Küvetten, bzw. Plattenphotometer einerseits und der UV-Detektionszelle des ÄKTA Basic 10 andererseits keine direkte Korrelation herleiten ließ, mussten eigene Kalibriergeraden mit Standardlösungen für die drei Proteine und die beiden Fluorophore Cy5 / Alexa488 aufgenommen werden.

Dazu wurden jeweils 100µl der Standardlösungen auf eine 1 ml HR 5/5 Säule gegeben, die mit nicht derivatisierter Sepharose gepackt war. Bei der Standard-Flussrate von $0,4 \text{ ml min}^{-1}$ mit einem Laufmittel von 150 mM NaCl / 150 mM NaOH (85% A2, 15% B1) wurden die Pulse auf die Säule gegeben und die resultierenden Banden bei den Absorptionsmaxima der Proteine (280 nm) und der beiden Fluorophore (519 nm, bzw. 664 nm) integriert. Für alle drei Wellenlängen ergab sich innerhalb des Flächenbereichs von $0 - 280 \text{ AU} \times \text{ml}$ als Funktion eines Konzentrationsbereichs $0-25 \text{ mg ml}^{-1}$, bzw. $0-50 \text{ mg ml}^{-1}$ für Mab02, bzw. BSA eine lineare Korrelation mit einer Regressionsgüte von 0,92 (Daten nicht gezeigt).

3.2.3 Experimente im Shallow Bed Modus

Die Shallow Bed Experimente wurden mit einem selbst konstruierten Modul durchgeführt, welches in seinem prinzipiellen Aufbau dem von *Linden* verwendeten Modul entspricht, wie es in **Bild 2.1** in Kapitel 2.1.2 skizziert ist [Linden 2001]. Die Anlage wurde in dieser Arbeit zur Aufnahme von Isothermendaten verwendet, wobei die Flüssigphase im Kreislauf durch das Säulenbett bis zur Einstellung des Adsorptionsgleichgewichtes gepumpt wurde (vgl. **Bild 3.5**). Ein Hauptziel dieses experimentellen Ansatzes war der Vergleich von zwei unterschiedlichen Beladungsmethoden bei Zugabe der gleichen Gesamtmenge an Protein pro gepacktes Adsorbensbett mit unterschiedlich konzentrierten Proteinlösungen: In einem Fall erfolgte die Zugabe inkrementell, indem Teilmengen der Proteinlösung nacheinander zugegeben wurden, im anderen Fall erfolgte die Zugabe in einem Schritt.

3 Material und Methoden

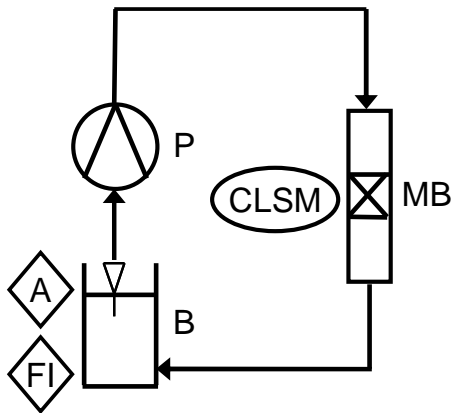


Bild 3.5: Skizze der verwendeten Miniatursäulen-Anlage.
In der Skizze ist lediglich einer von acht möglichen Kanälen gezeigt, die in analogem Aufbau parallel betrieben werden können. Die zu untersuchende Proteinprobe wird von der Schlauchpumpe (P) aus dem Behälter (B) gesaugt und durch das Miniatursäulenbett (MB) gepumpt. Die Anlage diente in dieser Arbeit zur Aufnahme von Isothermendaten und wurde somit im Kreislauf geführt. Die direkte Analyse der im Miniatursäulenbett gepackten Adsorberpartikel mit dem Konfokalen Laser Raster Mikroskop (CLSM) erfolgt in Echtzeit, die Analyse der Flüssigphase bezüglich Absorption (A) und Fluoreszenzintensität (FI) manuell.

Für die stufenweise Analyse der Adsorptionsgleichgewichte wurde unter isokratischen Bedingungen gearbeitet, wobei jeweils ein Puffer pro Messung verwendet wurde. Eine Liste der verwendeten Puffer ist in **Tabelle 3.9** dargestellt.

Tabelle 3.9: Liste der verwendeten Puffer für die Adsorptionsgleichgewichts Studien mit den Miniatursäulen

¹⁾ Verwendetes Protein: BSA - Rinderserumalbumin; ²⁾ verwendete Puffersysteme; vgl. **Tabelle 3.1**; ³⁾ Verwendete Adsorbentien: Butyl-Sepharose FF, Octyl-Sepharose FF, Phenyl-Sepharose FF low substitution, Phenyl-Sepharose FF high substitution, vgl. **Tabelle 3.3**.

Protein ¹⁾	Puffer ²⁾	Adsorbentien ³⁾
BSA	AS0000 / AS0350 / AS0700	Butyl
	AS1500 / AS2000	Octyl
	NC0000 / NC1250 / NC2500	Phenyl low
	NC3750 / NC5000	Phenyl high

3.2 Experimentelle Methoden

Mit dem verwendeten Modul können maximal 8 Experimente parallel durchgeführt werden, wobei für die direkte Analyse durch das Konfokale Laser Raster Mikroskop bestimmte Punkte im Säulenbett automatisch angesteuert werden können. Es wurden 500µl der Proteinlösungen in ein Eppendorf Gefäß vorgelegt, die eine Gesamtproteinkonzentration von $1,0 - 1,2 \text{ mg ml}^{-1}$ mit einem D/P-Gehalt von $0,06 - 0,08$ hatten. Bei diesem Experiment wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet. Mit einer 8-Kanal-Schlauchpumpe der Fa. Gilson wurden die Proteinlösungen mit einer Geschwindigkeit von $0,08 \text{ ml min}^{-1}$ durch das Säulenbett gepumpt und anschließend im Kreislauf zurück in die Probenvorlagegefäße geführt. Die direkte Analyse durch das CLSM erfolgte in Echtzeit, die indirekte Flüssigphasenanalyse erfolgte manuell nach Einstellung des Adsorptionsgleichgewichts, was einer Zeitspanne von 90 min entsprach. Dazu wurden 100µl der Proteinlösung entnommen und deren Extinktion bei 280 nm mit einem Küvetten Photometer der Fa. Varian gemessen.

3.2.4 Experimente im Finite Bath Modus

Im Gegensatz zu dem Stand der Technik bei Finite Bath Experimenten, der z.B. bei Anspach et. al. dokumentiert ist [Anspach et al. 1996], kamen bei dieser Arbeit ein miniaturisierter und weitgehend automatisierter Ansatz zum Einsatz. Nach manueller Vorbereitung der Puffer- und der Proteinstammlösungen sowie der Herstellung von Adsorbensplaques unter Verwendung eines entsprechenden Moduls (s. u.) wurden sämtliche weitere Laboroperationen von einer Roboterplattform durchgeführt [Bensch et al. 2005].

Plaquesanlage: Aliquotierung der Adsorbenspartikel

Um den Anforderungen an eine reproduzierbare, experimentell wenig aufwendige Methode zur Aliquotierung von scher- und austrocknungssensitiven Adsorbermaterialien gerecht zu werden, wurde eine Adsorberplaquesanlage entwickelt. Sowohl der im Forschungszentrum entwickelte Prototyp als auch das von der Atoll GmbH in Lizenz gebaute Serienmodell können pro Ansatz 96 zylinderförmige Volumeneinheiten aus Adsorberpartikeln, so genannte Adsorber-

3 Material und Methoden

/Partikelplaques, mit einem Zylindervolumen von 7 - 50µl herstellen. Dazu wird die Partikelsuspension mittels eines Vakuums von einem Reservoir in eine Schablone gesaugt, wo die Partikel durch einen Siebmechanismus zurückgehalten werden und so in den zylinderförmigen Auslassungen zu einem Haufwerk gepackt werden, wobei die aus Puffer bestehende Poren-, Haft- und Zwickelflüssigkeit erhalten bleibt. Der prinzipielle Aufbau beider Geräteversionen ist in **Bild 3.6** gezeigt.

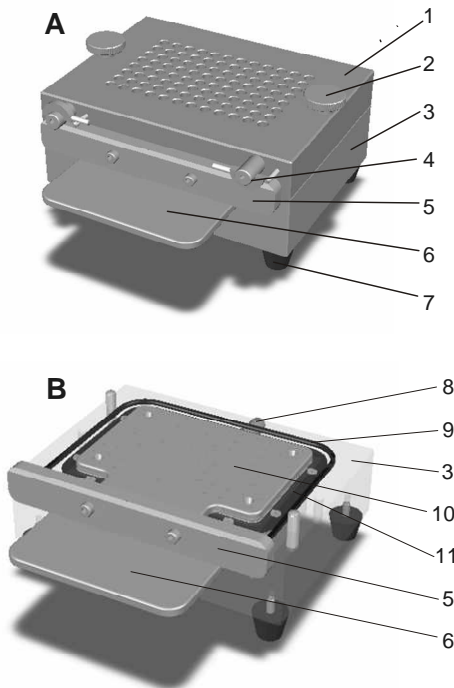
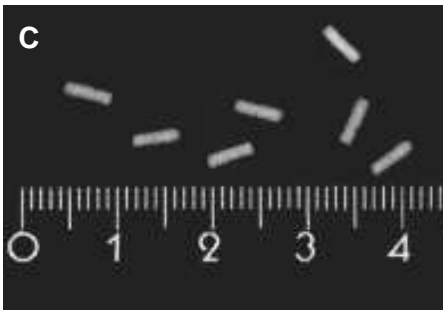


Bild 3.6: Schematische Darstellung der der Adsorberplaqueanlage (A, B) und Beispielbilder der mit dem Serienmodell hergestellten Partikelplaques (C).

Die Adsorberplaqueanlage ist schematisch in Abbildung A und B dargestellt. Die Partikelsuspension wird in einen Hohlraum gefüllt, der durch Reservoir (1), Schablone (10) und Fritte (11) begrenzt wird. Die Suspension wird durch ein Vakuum nach unten gesaugt, die Partikel werden durch die Fritte (11) zurückgehalten und in den zylinderförmigen Lochmasken der Schablone (10) gepackt.

(A) Komplett zusammen gesetzte Anlage und (B) untere Hälfte der Anlage. (1) Obere Gehäuseplatte, (2) Gerändelte Halterungsschrauben, (3) Untere Gehäuseplatte, (4) Einschubklammern, (5) Stopper-Platte, (6) Schiebergriff, (7) Standfüße, (8) Vakuum-Anschluß, (9) Dichtungsring, (10) Schablone, (11) Fritte mit Halterung

3.2 Experimentelle Methoden



Der Aufbau des Prototyps ist identisch.

(C): Beispielbilder von Adsorberplaques, die mit dem Serienmodell hergestellt worden sind. Die zylinderförmigen Plaques haben ein Volumen von $7,7 \mu\text{l}$ und weichen in ihrem Volumen um weniger als 2% voneinander ab.

Prinzipiell beschrieben wurde dieses Verfahren erstmals von Linden et. al. [Linden 2001], wobei ein Zentrifugalfeld anstatt eines Vakuums als Kraftfeld fungierte. Prototyp und Serienmodell unterscheiden sich bezüglich der verwendeten Materialien. Die Gehäuseplatten des Serienmodells (**Bild 3.6**, 1, 3) bestehen aus Duraluminium, die Schablone (**Bild 3.6**, 10) ist aus rostfreiem Stahl gefertigt. Die analogen Bauteile des Prototyps bestehen aus Plexiglas. Die Fritte (**Bild 3.6**, 11) ist in beiden Fällen aus rostfreiem Stahl hergestellt.

Die Herstellung erfolgte nach dem folgenden experimentellen Protokoll:

- i) 200-300 μl einer 30%-50% (v/v) Suspension des Adsorbensmaterials in 20% (v/v) Ethanol Lagerungslösung wurde pro Position in das Reservoir (**Bild 3.6**, Nr. 1) der Plaqueanlage gepackt.
- ii) Nach kurzem Anlegen des Vakuums für 30 sec folgten 4 Waschschrte, in denen jeweils 400 μl Milli-Q-Wasser pro Position zugegeben wurde und nach jeder Zugabe jeweils für 30 sec ein Vakuum angelegt wurde.
- iii) 400 μl Milli-Q-Wasser wurden pro Position hinzu gegeben und die Adsorbentien mit einer Pipette resuspendiert.
- iv) Ein Vakuum von 820-850 mbar wurde für 3 min angelegt.
- v) 400 μl Äquilibrium-/Adsorptionspuffer wurden pro Position hinzu gegeben, der Ansatz wurde für 1 min inkubiert.
- vi) Ein Vakuum von 820-850 mbar wurde für 15 min angelegt.
- vii) Die Schablone (**Bild 3.6**, Nr. 10) wurde aus dem Gehäuse (**Bild 3.6**, Nr. 1, 3) gezogen und mittels des komplementären 96 Pin Ausstoßers in eine tiefe, $96 \times 2 \text{ ml}$ fassende Mikrotiterplatte transferiert.

3 Material und Methoden

Der relative Fehler der Geräte liegt bei den für die Batch-Experimente relevanten proteinchromatographischen Materialien bestehend aus Sepharose FF und Zylindervolumina von 7,7 und 8,0 µl unter 2% (s. **Tabelle 3.10**, [Herrmann et al. 2006]).

Tabelle 3.10: Relative Fehler bei der 96-fachen Aliquotierung von Sepharose 4 FF Materialien ¹⁾ mittels der Adsorberplaqueanlage in der Prototyp / Serienmodell Version.

1) GE Healthcare, München, Deutschland; 2) Prototyp hergestellt im Forschungszentrum Jülich, Serienmodell hergestellt von der Atoll GmbH, Weingarten, Deutschland; 3) Zylindervolumen der Schablone; 4) Berechnetes Adsorbervolumen unter Annahme eines Lückengrades von 0,37 [Brauer 1971]; 5) Relativer Fehler der Adsorberaliquotierung indirekt ermittelt aus der Adsorptionskapazität bei zwei unterschiedlichen Flüssigphasenkonzentrationen im Gleichgewicht [Herrmann et al. 2006]).

Apparat ²⁾	V _{Zylinder} ³⁾ [µl]	V _{Adsorber} ⁴⁾ [µl]	Relativer Fehler ⁵⁾ [%]
Prototyp	8,0	5,0	1,97/1,96
Serienmodell	7,7	4,7	1,56/1,54

Messung von Kinetiken / Isothermen

Sämtliche in dieser Arbeit relevanten Batch-Kinetiken und –Isothermen wurden mit der Roboterplattform des Typs „Freedom EVO 200“ der Fa. Tecan durchgeführt. Der prinzipielle Aufbau der Plattform ist in **Bild 3.7** gezeigt.

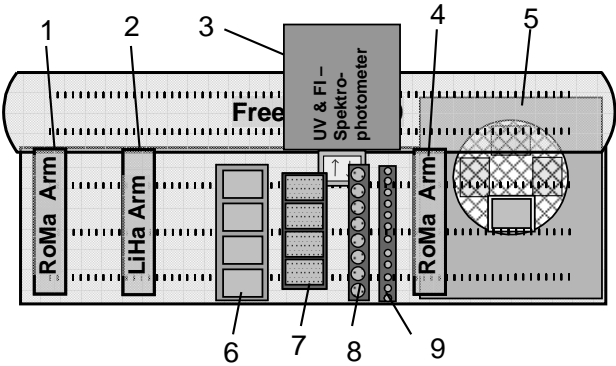


Bild 3.7: Skizze der verwendeten Roboterplattform Freedom EVO200.
Komponenten der Roboterplattform Freedom EVO 200 der Fa. Tecan: (1) Exzentrischer Greifarm; (2)

3.2 Experimentelle Methoden

8-Kanal-Pipettierarm mit fest installierten Spitzen; (3) UV- und FI Plattenphotospektrometer, Fa. Tecan; (4) Zentrischer Greifarm; (5) Mikrotiterplatten-Zentrifuge, Fa. Hettich; (6) 4-Positionen-Mikrotiterplatten-Orbitalschüttler, Fa. Variomag; (7) 4-Positionen-Mikrotiterplatten-Halter; (8) 8-Positionen Halter für 50ml Reaktionsgefäße; (9) 16-Positionen Halter für 15ml Reaktionsgefäße

Sowohl die Adsorptionsreaktionen als auch die Analyse der Flüssigphase erfolgte im 96er Mikrotiterplatten-Maßstab. Alle Messungen wurden im Doppelansatz bestimmt. Pro Messreihe wurden 10 zeitlich oder konzentrationsspezifisch variable Datenpunkte aufgenommen, die zusätzlich durch zwei Kontrollmessungen pro Messreihe ergänzt wurden. Kontrollmessung 1 beinhaltete stets die verwendete Proteinlösung, im Fall der Kinetik-Messungen in der konstant verwendeten Ausgangskonzentration, im Fall der Isothermenmessungen in der Ausgangskonzentration des Datenpunkts Nr. 5, womit ein Datenpunkt im Übergangsbereich der Isotherme zwischen dem linearen Anstieg zum einen und nahezu konstanter Sättigung zum anderen gewählt wurde. Ein Schema der Organisation einer jeden Mikrotiterplatte ist in **Tabelle 3.11** gezeigt.

Tabelle 3.11: Schematische Darstellung der Gliederung der Mikrotiterplatte
Eine Messreihe mit 10 zeitlich oder konzentrationsspezifisch variablen Datenpunkten wurde innerhalb einer Zeile auf der Mikrotiterplatte aufgenommen. Zusätzlich zu diesen Datenpunkten wurden pro Messreihe zwei Kontrollmessungen durchgeführt. Jede Messreihe wurde in einer Doppelbestimmung gemessen.

¹⁾ Konventionelle Angabe der Koordinaten einer Mikrotiterplatte mit fortlaufenden Nummern für die Zeilen und Großbuchstaben für die Spalten. ²⁾ Kontrollmessung 1: Reine Proteinlösung der jeweiligen Messreihe ohne Zugabe von Adsorbentien, im Fall der Kinetik-Messungen entspricht die Ausgangskonzentration der konstant verwendeten, im Fall der Kinetik-Messung der des Datenpunkts Nr. 5; ³⁾ Einer der 10 Datenpunkte (d) der Messreihe (m), entweder zeitlich (tm-d) oder konzentrationsspezifisch (cm-d) variabel. Jede Messreihe erfolgte in Doppelbestimmung und hatte somit einen Ansatz a und b. ⁴⁾ Kontrollmessung 2: Reine Proteinstammlösung der jeweiligen Messreihe mit nicht-funktionalisierter Sepharose 4FF

Reihe / Spalte ¹⁾	A ²⁾	B ³⁾	C ³⁾	...	F ³⁾	G ³⁾	H ⁴⁾
1	K1-1a	c/t 1- 1a	c/t 1- 2a	...	c/t 1- 9a	c/t 1- 10a	K1-2a
2	K1-1b	c/t 1- 1b	c/t 1- 2b	...	c/t 1- 9b	c/t 1- 10b	K1-2b
...	

3 Material und Methoden

Reihe / Spalte ¹⁾	A ²⁾	B ³⁾	C ³⁾	...	F ³⁾	G ³⁾	H ⁴⁾
7	K4-1a	c/t 4- 1a	c/t 4- 2a	...	c/t 4- 9a	c/t 4- 10a	K4-2a
8	K4-1b	c/t 4- 1b	c/t 4- 2b	...	c/t 4- 9b	c/t 4- 10b	K4-2b

Pro Messreihe wurde ein 50 ml Reaktionsgefäß mit Proteinstammlösung, einer Mischung aus markiertem und unmarkiertem Protein in dem jeweiligen Adsorptionspuffer, die nach dem in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Verfahren hergestellt wurde, in dem entsprechenden Halter, **Bild 3.7**, Nr. 8, auf der Roboter-Werkbank vorgelegt. Für die Doppelbestimmung wurden Aliquots derselben Stammlösung verwendet. Zusätzlich wurden zwei 15ml Reaktionsgefäße mit dem jeweiligen Adsorptionspuffer in dem Halter Nr. 9 in **Bild 3.7** vorgelegt.

Die Proteine BSA, Mab01 und Mab02 wurden zusammen mit den in **Tabelle 3.12** aufgelisteten Puffersystemen verwendet. Für die beiden Antikörper konnten die beiden höchsten Ammoniumsulfatkonzentrationen von 1,5 M und 2 M nicht verwendet werden.

Tabelle 3.12: Verwendete Proteine und Puffer für die Adsorptionsstudien im Finite Bath Modus

¹⁾ Verwendete Proteine: BSA-Rinderserumalbumin, Mab01 – humanisierter Antikörper01, Mab02 – humanisierter Antikörper 02, vgl. **Tabelle 3.1** ²⁾ Verwendete Puffer: Biochemische Standardpuffer, pH 7, mit verschiedenen Lösungsmittelmodifikatoren: Ammoniumsulfat (AS), Natriumchlorid (NC), Citrat (KCit, NCit) und Acetat (KAc), vgl. **Tabelle 3.4** ³⁾ Verwendete Adsorbentien: Butyl-Sepharose FF (BU), Octyl-Sepharose FF (OC), Phenyl-Sepharose mit hoher Lingandendichte (PH), bzw. mit niedriger Ligandendichte (PL). ⁴⁾ Diese Konzentrationen wurden nicht für die Studien mit den beiden Antikörpern Mab01 und Mab02 verwendet.

Protein ¹⁾	Puffer ²⁾	Adsorbentien ³⁾
BSA	AS0000 / AS0350 / AS0700 / AS1500 ⁴⁾ /	BU / OC
Mab01	AS2000 ⁴⁾	
Mab02	NC0000 / NC1250 / NC2500 / NC3750 / NC5000	PL / PH

Basierend auf einem Skript der zugehörigen Software Evoware wurden dann folgende experimentelle Schritte automatisch von dem Roboter durchgeführt.

3.2 Experimentelle Methoden

- i) In einer tiefen, 96×2 ml fassenden Mikrotiterplatte, die sich auf dem Halter Nr. 7 in **Bild 3.7** befand, wurden jeweils 750 μ l Ausgangs-Proteinlösungen für die jeweilige Platten-Koordinate durch Verdünnung der Stammlösung mit dem Adsorptionspuffer hergestellt. Die Pipettierarbeit wurde von dem 8-Kanal Pipettierarm, Komponente Nr. 2 in **Bild 3.7**, übernommen.
- ii) Diese in Schritt (i) hergestellte Platte wurde nun in eine zweite tiefe, $96 \times 1,2$ ml fassende Mikrotiterplatte repliziert. Diese Platte wurde zuvor nach dem bereits in diesem Kapitel beschriebenen Verfahren mit Adsorbensplaques beschickt, wobei sich in den Plattenspalten B bis G funktionalisierte Sepharose befand, in der Plattenspalte H hingegen nicht funktionalisierte Sepharose. Pro Koordinate wurden 500 μ l transferiert. Im fall der Isothermen Messungen erfolgte diese Plattenreplikation auf einmal, im Fall der Kinetik-Messungen wurden zuerst die Spalten A, B und H repliziert, die übrigen Spalten dann anhand der programmierten Zeitvorgaben auf dem Orbitalschüttler, der Komponente Nr. 6 in **Bild 3.7**.
- iii) Die Adsorbenspartikel wurden während der Inkubationsphase auf dem Orbitalschüttler, homogen in der Proteinlösung suspendiert. Im Fall der Isothermen Messungen betrug die Inkubationsdauer 180 min, im Fall der Kinetikmessungen war die Inkubationsdauer pro Plattenspalte unterschiedlich lang und orientierte sich an den Fixpunkten 2; 4; 7, 10, 15, 20, 25, 35, 50 und 90 min. Diese zeitliche Varianz wurde durch zeitlich variable Zugabe der Flüssigphase und gleichzeitiges Abstoppen der Adsorptionsreaktion erreicht. Die tatsächlichen Zeiten wichen im zweistelligen Sekundenbereich davon ab; für die Datenauswertungen wurden die von der robotereigenen Software protokollierten Zeiten verwendet.
- iv) Nach beendeter Inkubation wurde die Mikrotiterplatte automatisch in eine Schwingflügelzentrifuge der Fa. Hettich, Komponente 5 in **Bild 3.7**, transferiert und bei 50g für 3min zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Platte wieder auf den Plattenhalter gestellt.
- v) Von dem abzentrifugierten Überstand wurden pro Plattenposition jeweils zweimal 34, 67 oder 100 μ l je nach Anfangskonzentration oder Inkubationszeit des jeweiligen Ansatzes entnommen.

3 Material und Methoden

Analyse der Flüssigphase mittels Lichtextinktion und Fluoreszenz

Für die Analyse der Flüssigphase wurde die Mischung aus markierten und unmarkierten Proteinen sowohl bezüglich ihrer Absorption von monochromatischem Licht bei 280nm als auch der Fluoreszenzaktivität beim Absorptions- und Emissionsmaximum des jeweils verwendeten Fluorophors gemessen, im Fall des in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten Cy5 lag dies bei 646nm, bzw. 664nm. Eine Liste aller verwendeten Fluorophore und ihrer Charakteristika ist in **Tabelle 3.2** in Kapitel 3.1.2 enthalten. Die gemessene Lichtextinktion bei 280 nm wurde dann mithilfe von Materialkonstanten und der gemessenen normierten Fluoreszenzintensität (FI_{normiert}) korrigiert.

$$A_{280, \text{Messung, korrigiert}} = A_{280, \text{Messung}} - A_{280, \text{Nullwert}} - \dots$$

$$\dots \frac{c_{\text{Protein, gesamt}} \times D/P \times FI_{\text{normiert}} \times f_{\text{Korrektur } A_{280} / A_{646}}}{MW_{\text{Protein}} \times f_{A_{646} / \text{mol}}} \times 0,26 \quad (55)$$

Der korrigierte Messwert $A_{280, \text{Messung, korrigiert}}$ ergibt sich somit aus dem real gemessenen Wert $A_{280, \text{Messung}}$, von dem der Beitrag der 96er UV Platte und des Puffers zur Extinktion, die zusammen als Negativkontrolle $A_{280, \text{Nullwert}}$ gemessen werden können, subtrahiert wird. Für den Beitrag des Fluorophors zur Lichtextinktion wird hier anstatt der in Kapitel 2.4.1 beschriebenen Messung der Lichtextinktion beim Absorptionsmaximum des Fluorophors die Fluoreszenzintensität gemessen, um bei der vergleichsweise niedrigeren Fluorophorkonzentration eine ausreichende Sensitivität zu gewährleisten. Die im Folgenden beschriebenen Schritte erfolgten im Anschluss an das im vorigen Kapitel dargestellten Protokoll und starteten zeitgleich mit der im nachfolgenden Kapitel beschriebenen direkten Analyse der Adsorbenspartikel:

- vi) Die pro Plattenposition doppelt entnommenen 34, 67 oder 100µl wurden sowohl in eine UV transparente 96er Mikrotiterplatte ‚UV Star‘ der Fa. Greiner als auch in eine Fluoreszenz-96er Mikrotiterplatte ‚FluoroNunc‘ der Fa. Nunc transferiert. Das Flüssigkeitsvolumen wurde anschließend auf 100µl pro Plattenposition mit dem entsprechenden Adsorptionspuffer aufgefüllt.

3.2 Experimentelle Methoden

- vii) Die so hergestellten Analyseplatten wurden mit dem integrierten Absorptions- und Fluoreszenzspektrometer ‚Genios Pro‘ der Fa. Tecan, Komponente Nr. 3 in **Bild 3.7**, gemessen.

Analyse der Adsorbentien mittels CLSM

Die Mikroskopierarbeit zur Messung des emittierten Fluoreszenzsignals von der Äquatorialebene der Adsorbentien erfolgte manuell und startete zeitgleich mit der automatisch ablaufenden Analyse der Flüssigphase, die im vorigen Kapitel beschrieben ist. Nach Abschluss der dort dargestellten experimentellen Schritte wurde die $96 \times 1,2$ ml Mikrotiterplatte von der Roboterplattform zum Mikroskopierplatz transferiert. Die im Folgenden aufgelisteten Schritte wurden pro Plattenposition vollständig durchlaufen und für jede Position von Beginn an wiederholt:

- viii) 100 µl der Partikelsuspension wurden manuell in eine 96×350 µl Mikrotiterplatte mit Glasboden transferiert.
- ix) Im Reflexionsmodus des CLSM wurde ein Partikel mit einem Durchmesser von $88 - 96$ µm gesucht und auf dessen Äquatorialebene fokussiert. Der Reflexionsmodus ist dadurch definiert, dass das gesamte Spektrum des sichtbaren Lichts ungefiltert zum Detektor gelangt und somit jedes nicht-transparente Objekt wie einem konventionellen Lichtmikroskop auch ohne Fluoreszenzsignal in seinen Umrissen klar abgebildet werden kann.
- x) Für die hauptsächlich durchgeführten Einkanalmessungen wurden die in **Tabelle 3.13** aufgelisteten Einstellungen verwendet.

Tabelle 3.13: Verwendete Mikroskopeinstellungen am CLSM

Die Tabelle zeigt die Einstellungen, die mittels der zugehörigen Software vorgenommen wurden.

(1) Referenz-Nummern der in **Bild 2.6** skizzierten Komponenten.

Mikroskop-Komponente	Referenz-Nr. ¹⁾	Wert
Helium-Neon-Laser:	1	
Emissionswellenlänge		633 nm
Leistung		1 mW
Einstellung		40 %

3 Material und Methoden

Mikroskop-Komponente	Referenz-Nr. ¹⁾	Wert
Hauptfarbteiler	3	477 / 543 nm
Objektiv	5	C-Apochromat 63×/1.2 Wcorr
Nebenfarbteiler	8	635 nm
Lochblendendurchmesser	10	143 µm
Emissionsfilter	11	650 nm

xi) Die Abrasterung erfolgte in der x-y-Ebene wie in **Bild 2.5** schematisch gezeigt. Es wurde im so genannten „Multitrack-Verfahren“, d.h. von links nach rechts bei ungeraden Zeilenindizes und direkt anschließend von rechts nach links bei geraden Zeilenindizes abgerastert. Bei einer Pixelfläche von $0,29 \times 0,29 \mu\text{m}$ und einer Anzahl von 512×512 Pixels ergab sich eine Bildgröße von $146,2 \times 146,2 \mu\text{m}$.

Untersuchung von Löslichkeiten

Bei dieser Methode handelt es sich um eine Modifikation der Isothermen-Messungen im Finite Bath Modus, wie sie oben beschrieben sind. Dabei wird analog zu den dort dargestellten Kontrollmessungen lediglich Proteinlösung in dem zu untersuchenden Puffer wie bei einer Isothermenmessung auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Die verwendeten Proteinkonzentrationen waren dabei 0,5 und 1 mg ml⁻¹. Der Überstand wird danach einer „Trübungsmessung“, d.h. einer Messung der Absorption bei 590 nm, unterzogen. Alle in Kapitel 3.1.1 aufgelisteten Proteine fanden Verwendung, **Tabelle 3.13** fasst die untersuchten experimentellen Systeme zusammen.

3.2 Experimentelle Methoden

Tabelle 3.13: Für die Löslichkeitsexperimente verwendete Proteine, Puffer und Adsorbentien.

¹⁾ Verwendete Proteine: BSA-Rinderserumalbumin, Mab01 – humanisierter Antikörper01, Mab02 – humanisierter Antikörper 02, vgl. **Tabelle 3.1.** ²⁾ Verwendete Puffer: Biochemische Standardpuffer, pH 7, mit verschiedenen Lösungsmittelmodifikatoren: Ammoniumsulfat (AS), Natriumchlorid (NC), Citrat (KCit, NCit) und Acetat (KAc), vgl. **Tabelle 3.4** ³⁾ Verwendete Adsorbentien: Butyl-Sepharose FF (BU), Octyl-Sepharose FF (OC), Phenyl-Sepharose mit hoher Ligandendichte (PH), bzw. mit niedriger Ligandendichte (PL).

Protein ¹⁾	Puffer ²⁾	Adsorbentien ³⁾
BSA	AS0000 / AS0350 / AS0700 / AS1500 /	BU
Mab01	AS2000	OC
Mab02	NC0000 / NC1250 / NC2500 / NC3750 /	PL
	NC5000	PH
	KCit0100 / KCit0500	
	NCit0100 / NCit0500	
	KAc1000 / KAc2500 / KAc5000	

In situ Markierung adsorbierter Proteine auf der Partikeloberfläche

Bei dieser Methode handelt es sich um eine Kombination von Anwendungen aus der allgemeinen Markierungsreaktion, die in Kapitel 3.2.1 beschrieben wird, und den Adsorptionsversuchen im Finite Bath Modus, die oben beschrieben sind.

Die experimentelle Durchführung erfolgte zunächst bis einschließlich Schritt (iv) im dort dargestellten Protokoll. Daran schlossen sich folgende Schritte an (vgl.

Bild 3.8):

- v) 475 µl des Überstandes wurden abgenommen und durch eine Größenausschluss-Chromatographiesäule aufgetrennt. Verwendet wurde eine Tricorn XK 16/20 Säule gepackt mit G25 Superfine Material der Fa. GE Healthcare.
- vi) Pro Plattenposition wurden jeweils 500 µl einer Lösung des Fluorophors Atto465 in Adsorptionspuffer zugegeben. Die Konzentration desselben wurde so eingestellt, dass das Mengenverhältnis an Fluorophor in Lösung in Relation zu der adsorbierten Gesamtproteinmenge 2,5:1 betrug. Dies entsprach in etwa der doppelten Menge an eingesetztem Fluorophor bezogen auf die reine Markierungsreaktion in Lösung, die in Kapitel 3.2.1 dargestellt ist.
- vii) Die Mikrotiterplatte wurde 15min auf dem Orbitalschüttler inkubiert

3 Material und Methoden

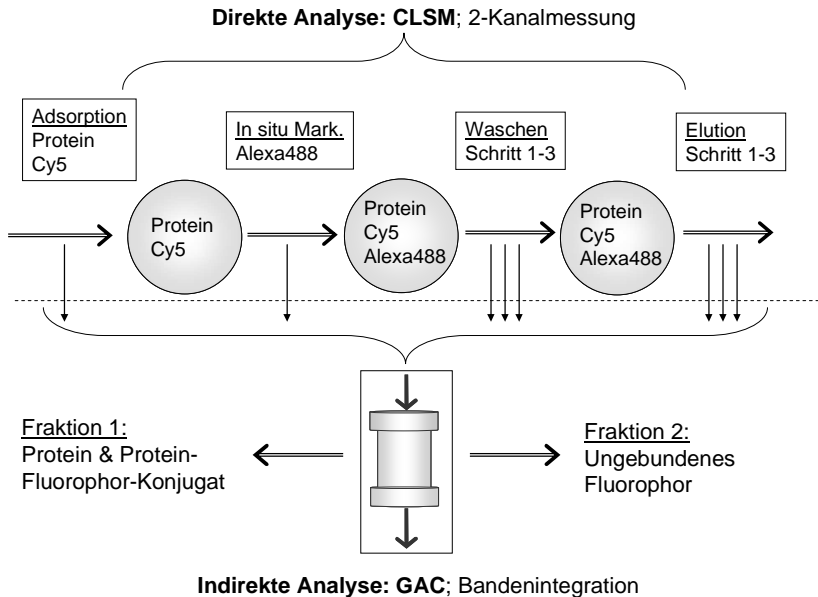


Bild 3.8: Schematische Darstellung der In Situ Markierungsexperimente.

Für die In Situ Markierungsreaktion wurden die Adsorbentien zuerst mit Cy5 markierten Proteinen analog zu regulären Adsorptionsstudien beladen. Danach wurden die bereits beladenen Adsorbentien mit einem weiteren Fluorophor, Alexa 488, inkubiert, es folgten 3 Waschschrte sowie 3 Elutionsschritte, wo das adsorbierte Protein wieder desorbiert wurde. Die Überstände aller Schritte wurden in zweierlei Hinsicht analysiert: Zum einen mittels einer Größenausschluss-Chromatographiesäule, um ungebundenes Fluorophor von gebundenem zu unterscheiden. Die beiden Fluorophortypen konnten durch ihr charakteristisches Absorptionsmaximum unterschieden werden.

- viii) 500 µl Überstand wurden abgenommen und durch eine Größenausschluss-Chromatographiesäule (Tricorn XK 16/20 Säule gepackt mit G25 Superfine Material) aufgetrennt.
- ix) Jeweils dreimal 500 µl Adsorptionspuffer wurden zugegeben, die Mikrotiterplatte 30 sec auf dem Orbitalschüttler inkubiert und 500 µl des Überstandes wieder abgenommen. Die Überstände dieser Waschschrte wurden jeweils durch eine Größenausschluss-Chromatographiesäule (s.o.) aufgetrennt.

3.2 Experimentelle Methoden

- x) Jeweils dreimal 500 µl Elutionspuffer wurden zugegeben, die Mikrotiterplatte 5 min auf dem Orbitalschüttler inkubiert und 500 µl des Überstandes wieder abgenommen. Die Überstände dieser Elutionsschritte wurden jeweils durch eine Größenausschluss-Chromatographiesäule (s.o.) aufgetrennt.

Wie in **Bild 3.8** dargestellt wurden die Adsorbentien nach jeder Wiederholung der Schritte (viii) – (x) mit dem CLSM analysiert. Bei dieser Zweikanalmessung unterschieden sich die Mikroskopeinstellung von denjenigen, welche ansonsten in der Arbeit Verwendung fanden und in **Tabelle 3.13** beschrieben wurden. Die für diese Experimente speziellen Einstellungen sind in **Tabelle 3.14** aufgelistet.

Tabelle 3.14: Einstellungen am CLSM für die Zweikanalmessungen der In-situ Färbungsproben.

Die Tabelle zeigt die Einstellungen, die mittels der zugehörigen Software vorgenommen wurden.

¹⁾ Referenz-Nummern der in **Bild 2.5** skizzierten Komponenten.

Mikroskop-Komponente	Referenz-Nr. ¹⁾	Wert
Helium-Neon-Laser:	1	
Emissionswellenlänge		633 nm
Leistung		1 mW
Einstellung		40 %
Argon-Laser:	(1)	
Emissionswellenlänge		488 nm
Leistung		40 mW
Einstellung		35%
Hauptfarbteiler	3	477 / 543 nm
Objektiv	5	C-Apochromat 63×/1.2 Wcorr
Nebenfarbteiler 1	8	635 nm
Nebenfarbteiler 2	(8)	545 nm
Lochblendendurchmesser 1	10	143 µm
Lochblendendurchmesser 2	(10)	117 µm
Emissionsfilter 1	11	650 nm
Emissionsfilter 2	(11)	475 nm

3 Material und Methoden

Die Proben wurden vor dem Aufgeben auf die GAC-Säule so verdünnt, dass die gemessenen Absorptionswerte bei 280nm sowie bei den beiden Maxima der Fluorophore, 646nm und 495nm, nach Trennung mittels GAC im linearen Detektionsbereich lagen. Die im Chromatogramm erhaltenen Banden konnten somit direkt integriert und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Da sich die Extinktion bei den beiden Fluorophormaxima additiv aus allen drei oben genannten Extinktionswerten zusammensetzte und deren genauer Anteil unbestimmbar war und zudem ein ungefähres Mengenverhältnis der beiden Fluorophore im konjugierten Zustand von 1:1 angestrebt wurde, fand keine Korrektur der Signalintensitäten für diese semi-quantitativen Messungen statt. Die in **Tabelle 3.15** dargestellten chromatographischen Systeme fanden Verwendung:

Tabelle 3.15: Verwendete Protein-Puffersysteme bei der In-situ Markierung adsorbierter Proteine

¹⁾ Verwendete Proteine: BSA und Mab02, vgl. **Tabelle 3.1**, ²⁾ Verwendete Adsorbentien: BU – Butyl-Sepharose FF, OC – Octyl-Sepharose FF, PL – Phenyl-Sepharose low substitution, PH – Phenyl-Sepharose FF high substitution, vgl. **Tabelle 3.3**; ³⁾ Verwendet Puffer: Phosphatpuffer, pH7, mit Ammoniumsulfat (AS) und Natriumchlorid (NC) als Lösungsmittelmodifikator, vgl. **Tabelle 3.4**, ²⁾ Mengenkonzentration an Puffersalz ⁴⁾ Diese Konzentration wurde nicht für die Studien mit dem Antikörper Mab02 verwendet.

Proteine ¹⁾	Adsorbentien ²⁾	Puffersalz ³⁾
BSA	BU	AS500 / AS2000 ⁴⁾
Mab02	OC	NC1000 / NC5000 ⁴⁾
	PL	
	PH	

3.3 Erstellung intrapartikulärer Konzentrationsprofile

Die Verwendung der CLSM als zusätzliche Analyseverfahren erlaubte es, zusätzlich zu den dynamischen oder statischen Kapazitäten der Adsorbentien den Kapazitätsverlauf im Inneren eines Referenzpartikels zu betrachten. Da es sich bei den untersuchten Adsorbensmaterialien um eine Partikelschar mit heterogener

3.3 Erstellung intrapartikulärer Konzentrationsprofile

Größenverteilung handelte, wurde dem als radialsymmetrisch angenommenen Referenzpartikel der mittlere Radius der Partikelschar unter der Annahme einer Normalverteilung zugeordnet. Die Erstellung solcher intrapartikulärer Konzentrationsprofile erfolgte in drei Schritten:

- Das erhaltene Fluoreszenzsignal wurde radial gemittelt und damit gegenüber dem Messrauschen geglättet.
- Das so erhaltene Fluoreszenzsignal unterlag Lichtabschwächungseffekten und wurde um diese korrigiert.
- Das korrigierte Fluoreszenzsignal wurde mittels der Massenbilanz, die durch die indirekte Analyse erhalten wurde, in absolute Konzentrationsprofile innerhalb des Referenzpartikels umgerechnet.

3.3.1 Radiale Mittelung des gemessenen Fluoreszenzsignals

Durch die in **Kapitel 3.2.4** beschriebenen Messungen wurde ein zweidimensionales Fluoreszenzintensitätsprofil erhalten, welches die durch die Lichtabschwächungseffekte verfälschte Verteilung an markiertem Protein in der Äquatorialebene des untersuchten Adsorbens darstellt. Die Fluoreszenzintensität ist in relativen Einheiten (engl. Arbitrary Units, AU) angegeben und kann in zwei unterschiedlichen Auflösungen in Abhängigkeit von der zur Darstellung verwendeten Bit-Zahl bestimmt werden. Im 8-bit Scan beträgt die Auflösung 256 Inkremente, im 16-bit Scan 1024; Verwendung fand lediglich der 8-bit Scan. Die radiale Mittelung der FI-Signale erfolgte analog zu den Arbeiten von Hubbuch et. al. sowie Linden et. al. ([Linden 2001; Hubbuch et al. 2002]) anhand von (56).

$$FI_{r_i, m} = \frac{\sum FI_{r_i}}{n_{r_i}}, \text{ für } r_i = (r_0, \dots, r_i, \dots, R_p) \quad (56)$$

Die Fluoreszenzsignale auf einer Radialposition des kreisförmigen Intensitätsprofils, $FI_{r_i, m}$, wurde dabei gemittelt, indem sämtliche Pixelintensitäten FI_{r_i} auf einer Kreisbahn addiert wurden und durch die vorhandene Anzahl in Pixeln auf dieser Kreisbahn n_{r_i} dividiert wurden.

3 Material und Methoden

3.3.2 Korrektur der Lichtabschwächung

Ermittlung der Extinktionskoeffizienten

Gemäß dem *Lambert-Beer* Gesetz, definiert in (36) erfolgt die Lichtabschwächung bei konstanter Konzentration an Absorptiva, d.h. bei homogener Adsorbensbeladung, exponentiell mit der Weglänge. Ein solcher Zusammenhang ist für die hier untersuchten Systeme nur für den Fall erklärbar, wenn die Proteine homogen über die Adsorbentien verteilt sind. Die durchgeführten z-Scans zeigten keine exponentielle Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Weglänge des Messlichtstrahls wodurch die untersuchten Adsorbenspartikel nicht homogen mit Proteinen beladen sein konnten (Daten nicht gezeigt). Dies machte eine Korrektur der Messsignale notwendig.

Folglich wurde die normierte intrapartikuläre Proteinbeladung \bar{q}_r , wie sie in (49) eingeführt wurde, demnach zwar als radialsymmetrisch, nicht aber als konstant angenommen. Sie wurde stattdessen durch eine quadratische Funktion nach (57) beschrieben.

$$\bar{q}_r = (1 - a_0) \bar{r}^2 + a_0 = (1 - a_0) (\bar{x}^2 + \bar{z}^2) + a_0 \quad (57)$$

Die Konstante a_0 der quadratischen Funktion ist in diesem Zusammenhang für das Mengenverhältnis des markierten Proteins in der Partikelmitte im Vergleich zu dem Partikelrand. Der für die Normierung notwendige absolute Wert q_{Rp} kann errechnet werden, indem zunächst der Absolutwert für die Proteinbeladung für einen Referenz-Adsorbenspartikel aus der Massenbilanz der Flüssigphasendaten nach (58) errechnet wird.

$$q_{m,Ads,P} = q_{m,Ads,ges} \frac{\frac{4}{3} \pi R_P^3}{V_{Ads,ges}} = (c_0 - c^*) V_{Fl} \frac{\frac{4}{3} \pi R_P^3}{V_{Ads,ges}} \quad (58)$$

Aus der Abnahme der Proteinmenge in der Flüssigphase $(c_0 - c^*) V_{Fl}$ ergibt sich die Gesamtbeladung $q_{m,Ads,ges}$ der gesamten heterogenen Partikelschar mit dem

3.3 Erstellung intrapartikulärer Konzentrationsprofile

Volumen $V_{\text{Ads,ges}}$. Der Absolutwert der Proteinbeladung eines Adsorbenspartikels ist gleichermaßen auch proportional zu dem volumetrischen Integral eines Referenz-Adsorbenspartikels nach (59).

$$q_{\text{m,Ads,P}} = \alpha \int_0^{R_P} 4\pi r^2 FI \, dr = 4\pi \int_0^{R_P} r^2 q_r \, dr = 4\pi R_P^3 q_{R_P} \int_0^1 \bar{r}^2 \bar{q}_r \, d\bar{r} \quad (59)$$

Aus (57) – (59) ergibt sich für den Absolutwert der Proteinbeladung am Partikelrand nach (60).

$$q_{R_P} = (c_0 - c^*) \frac{V_{\text{FI}}}{V_{\text{Ads,ges}}} \frac{5}{(3 + 2a_0)} \quad (60)$$

Zur Bestimmung der Extinktionskoeffizienten wurde das Gleichungssystem bestehend aus den Gleichungen (50), (57) und (60) in ein MATLAB Script implementiert. Die Abschätzung der Parameter erfolgte mittels der Methode der kleinsten Fehlerquadrate, die Abweichung der Simulationsergebnisse von den experimentellen Daten wird in der MATLAB-Funktion „fminsearch“ mittels des „Simplex-Nelder-Mead“-Algorithmus minimiert. Basierend auf Finite Bath-Experimenten mit dem System Mab02 / Butyl-Sepharose FF wurden für die $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Konzentrationen 0,35 M und 0,7 M jeweils 3 Partikel analysiert. Basierend auf diesen 6 Datensätzen erfolgte die Parameteranpassung, wobei für den konzentrationsunabhängigen Extinktionskoeffizienten ϵ_{Matrix} ein Wert von $6,14 \times 10^1 \text{ cm}^{-1}$ gefunden wurde, für den konzentrationsabhängigen Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{\text{Fluorophor}}$ ein Wert von $3,22 \times 10^{-2} \text{ cm}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ ml}$.

Korrektur des Fluoreszenzintensitätsprofils

Die Korrektur der Lichtabschwächung an einem beliebigen Punkt in der x-z-Ebene kann folglich explizit über die Multiplikation des Messwertes mit dem exponentiellen Korrekturterm erfolgen (61).

3 Material und Methoden

$$I_{\text{kor}}(x, z) = I_{\text{em}}(x, z) \exp \left\{ \varepsilon_{\text{Matrix}} \left(\sqrt{R_p^2 - x^2} - z \right) \right\} \quad (61)$$

Erfolgt der Scan in der x-y-Äquatorialebene des Partikels ($z=0$) ist die Weglänge für die Lichtstrahlen jeweils der maximale von der Kugeloberfläche zu der Äquatorialebene und (61) vereinfacht sich zu (62).

$$I_{\text{kor}}(x) = I_{\text{em}}(x) \exp \left(\varepsilon_{\text{Matrix}} \sqrt{R_p^2 - x^2} \right) \quad (62)$$

Die Signalkorrektur wurde auf alle Batch-Experimente, bei denen ausschließlich Sepharose-Partikel Verwendung fanden, angewandt. Ein Beispiel ist in **Bild 3.9** dargestellt.

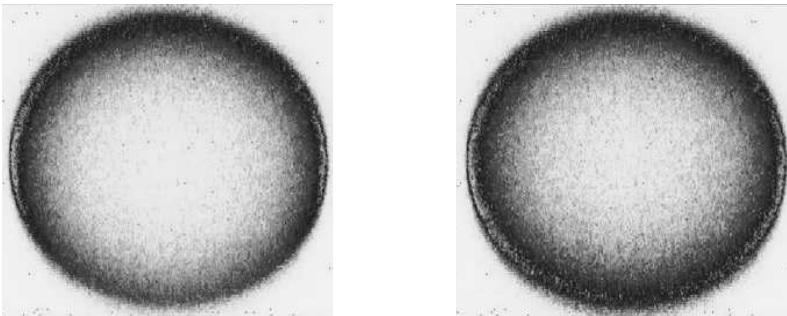


Bild 3.9: Rohdaten und korrigiertes Fluoreszenzintensitätsprofil eines Butyl-Sepharose Partikels in der x-y-Äquatorialebene.

Partikeldurchmesser: 88 μm , Proteinbeladung 5,5 mg ml^{-1} , Rohdaten links, korrigiertes Profil rechts.

3.3.3 Erstellung absoluter intrapartikulärer Konzentrationsprofile

Für die Erstellung absoluter intrapartikulärer Konzentrationsprofile werden die absoluten Kapazitäten aller Adsorbensschalen über deren normierten Radien aufgetragen. Die Normierung des Radius ist notwendig, weil für die CLSM-Analyse der Radius der untersuchten Partikel in einem Bereich von 44 bis 48 μm schwankte, wie in Kapitel 3.2.4 dargestellt. Mit (58) und (59) ergibt sich für die absolute Konzentration einer Adsorbensschale mit dem Radius \bar{r}_i der in (63)

3.3 Erstellung intrapartikulärer Konzentrationsprofile

dargestellte Zusammenhang, wie er z.B. bei *Hubbuch et. al.* in nicht normierter Form dargestellt ist [Hubbuch et al. 2002].

$$q_{m, Ads, S(r=i)} = \frac{FI_{V, S(r=i)}}{FI_{V, P}} q_{m, Ads, P} = \frac{(\bar{r}_i^3 - \bar{r}_{i-1}^3) FI_i}{\sum_{\bar{r}_0+1}^1 (\bar{r}_j^3 - \bar{r}_{j-1}^3) FI_j} q_{m, Ads, P} \quad (63)$$

Die absolute Kapazität $q_{m, Ads, S(r=i)}$ einer Adsorbenschale mit der Breite eines Pixels aus der CLSM-Analyse basierend auf dem radial gemittelten Pixel auf der radialen Position i ergibt sich aus dem relativen Anteil der volumetrischen Fluoreszenzintensität der Adsorbenschale $FI_{V, S(r=i)}$ zu der volumetrischen Fluoreszenzintensität des gesamten Referenzpartikels $FI_{V, P}$. Die volumetrischen Fluoreszenzintensitäten der Adsorbenschalen ergeben sich aus einem Produkt zweier Faktoren: Dem Volumen des Kugelausschnittes $(\bar{r}_i^3 - \bar{r}_{i-1}^3)$ gebildet aus den Pixeln auf der radialen Position i und der radial gemittelten Fluoreszenzintensität dieser Pixel FI_i . Die volumetrische Fluoreszenzintensität des Partikels berechnet sich aus der Summe aller Schalenintensitäten.

4 Ergebnisse

4.1 Löslichkeiten der Proteine in verschiedenen HIC Puffersystemen

Die Vorauswahl an Proteinen umfasste zwei Gruppen: Die eine Gruppe bestand aus Modellproteinen mit je einem Vertreter von vier Kategorien, die von der Arbeitsgruppe *Przybycien et. al.* bezüglich des strukturellen Verhaltens auf Umkehrphasen-Chromatographiematerial aufgestellt wurden [Sane et al. 1999; Vedantham et al. 2000]. Die zweite Gruppe umfasste zwei monoklonale Antikörper als Vertreter der häufigsten Produktkategorie in der pharmazeutischen Biotechnologie. Diese sechs Proteine wurden bezüglich ihrer Löslichkeit in verschiedenen HIC-Puffersystemen, die in **Tabelle 3.4** aufgelistet sind, untersucht. Die experimentelle Durchführung ist im selben Kapitel beschrieben. Zwei Proteinkonzentrationen, 0,5 und 1 mg ml⁻¹, wurden verwendet. In **Tabelle 4.1** sind für die untersuchten Proteine die Untergrenzen für die Konzentrationen und kosmotropen Agenzien angegeben, bei denen das untersuchte Protein stabil in Lösung blieb und nicht präzipitierte. Die Ergebnisse unterschieden sich für die beiden verwendeten Proteinkonzentrationen nicht (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 4.1: Ergebnisse der Löslichkeitsstudien für die sechs untersuchten Proteine

Angegeben sind die minimalen Salzkonzentrationen der Lösungsmittelmodifikatoren, bei denen Trübung, d.h. eine erhöhte Absorption bei 590 nm gemessen wurde. Es wurden dabei zwei Proteinkonzentrationen verwendet, 0,5 und 1 mg ml⁻¹, deren Ergebnisse sich nicht unterschieden. Da die Messungen in Inkrementen erfolgte und Salzkonzentrationen verwendet wurden, bei denen auch Potential für eine spätere Proteinadsorption bei HIC Experimenten vorhanden war, bedeuten die angegebenen Werte nicht die absoluten Minima, welche bei niedrigeren Werten als den angebenen liegen können.

¹⁾ vgl. **Tabelle 3.1:** Rinderserumalbumin (BSA), Lysozym (LYS), Ovalbumin (OVA), Concanavalin A (ConA), Monoklonaler Antikörper 1 & 2 (Mab01 & 02); ²⁾ vgl. **Tabelle 3.4:** Puffersalze: Kaliumphosphat (K₂HPO₄), Natriumphosphat (Na₂HPO₄); Lösungsmittelmodifikatoren: Ammoniumsulfat (NH₄)₂SO₄, Natriumchlorid (NaCl), Kalium- / Natriumcitrat ([K₃/Na₃]C(CO₂)OH(CH₂CO₂)₂ und Ammoniumacetat (NH₄CH₃CO₂).

4.2 Einfluss der Proteinmarkierung auf das Adsorptionsverhalten

Protein¹⁾ / Lösungsmittel- modifikator²⁾	BSA [mM]	LYS [mM]	OVA [mM]	ConA [mM]	Mab01 [mM]	Mab02 [mM]
(NH ₄) ₂ SO ₄	>2000	350	350	350	1000	1000
NaCl	>5000	1250	1250	1250	>5000	>5000
K ₃ C(CO ₂)OH...	>500	100	100	100	500	>500
...(CH ₂ CO ₂) ₂						
Na ₃ C(CO ₂)OH...	>500	100	100	100	500	>500
...(CH ₂ CO ₂) ₂						
NH ₄ CH ₃ CO ₂	>500	100	100	100	>500	>500

Für jede untersuchte Proteinspezies konnten somit spezifische und von der Salzart abhängige Salzkonzentrationen bestimmt werden, welche die jeweilige Aggregatbildung und daraus folgend die Präzipitation auslösten.

Drei geeignete Proteine und zwei Puffersysteme gingen aus dieser Löslichkeitsstudie hervor, die bei relativ hohen potentiellen Kapazitäten auf HIC Adsorbentien noch löslich waren: BSA, Mab01 und Mab02. Als Puffersysteme wurden die beiden Phosphatpuffersysteme mit Ammoniumsulfat und Natriumchlorid als Modifikatoren ausgewählt.

4.2 Einfluss der Proteinmarkierung mit Fluorophoren auf das Adsorptionsverhalten

Für die Anwendung eines 1-Photonenmikroskops bei der CLSM-Analyse ist die Verwendung markierter und damit modifizierter Proteine notwendig. Für die Interpretation der gemessenen Daten ist es somit essentiell zu wissen, in welchem Ausmaß die Modifikation mit Fluorophoren die Sorptionseigenschaften der untersuchten Proteine innerhalb der verwendeten Prozessbedingungen verändert.

4 Ergebnisse

4.2.1 Dynamische Sorptionsstudien im Säulenmodus mit indirekter Analyse

RP-HPLC Pulsexperimente

Bei Untersuchungen zum Retentionsverhalten von reinen Fluorophoren auf der in Kapitel 3.2.2 näher beschriebenen Nucleosil C-18 Säule wurden vier verschiedene Fluorophore verwendet: Cy3 und Cy5 der Fa. GE Healthcare, Bodipy FL der Fa. Atto Tec und Alexa 488 der Fa. Molecular Partners. Die wesentlichen Eigenschaften der Fluorophore sind in **Tabelle 3.2** aufgelistet. Bei den Pulsantwortexperimenten zeigten die Fluorophore unterschiedliches Retentionsverhalten (vgl. **Bild 4.1**).

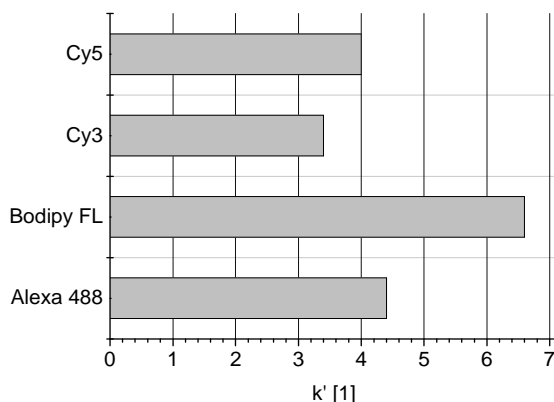


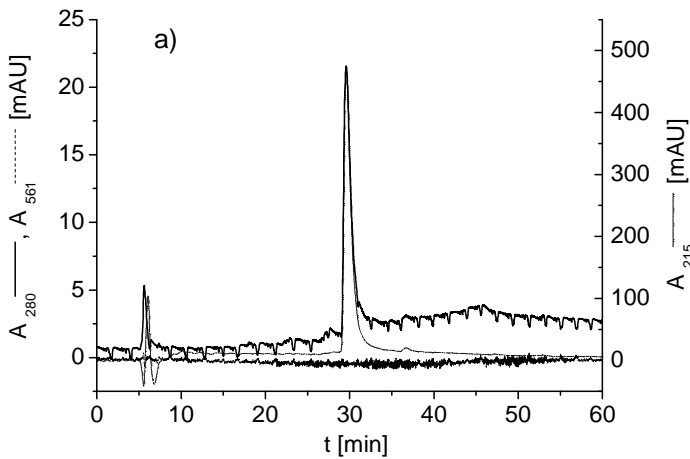
Bild 4.1: RP-HPLC Pulsexperimente: Retentionsverhalten von verschiedenen Fluorophoren.

Die um das Totvolumen der HPLC-Anlage korrigierte Retentionszeit ist in dimensionsloser Form als Vielfaches einer unretardierte Probe für vier verschiedene Fluorophore aufgetragen. Das Retentionsverhalten der Fluorophore wird mit zunehmender Größe des aromatischen Systems und abnehmender Zahl ionischer Gruppen stärker

4.2 Einfluss der Proteinmarkierung auf das Adsorptionsverhalten

Die Ergebnisse dieser Pulsantwortexperimente auf einer RP-Säule stimmen qualitativ mit den Ergebnissen von *Buschmann et. al.* überein [Buschmann et al. 2003] und werden in **Kapitel 5.1.2** diskutiert.

Hatten die vier untersuchten Fluorophore als Einzelmoleküle ein unterschiedliches Retentionsverhalten, so unterschied sich das Retentionsverhalten des markierten Proteins im Vergleich zum unmarkierten bei sieben von acht der untersuchten Systeme nicht. **Bild 4.2** zeigt ein repräsentatives Beispiel für das Protein BSA und das Fluorophor Cy3.



4 Ergebnisse

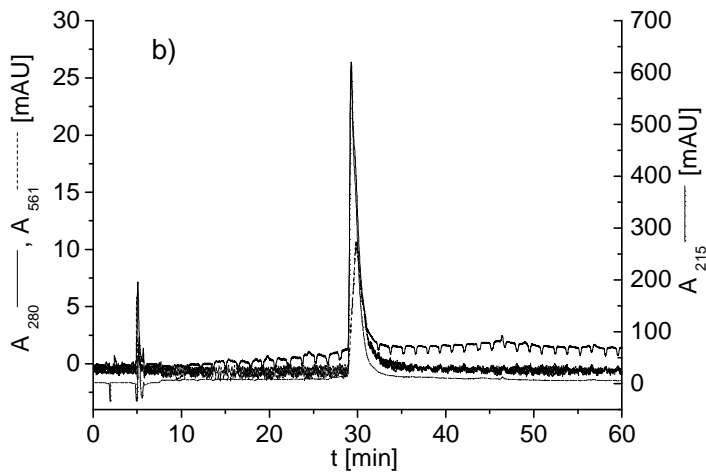


Bild 4.2: RP-HPLC Pulseexperimente: Retentionsverhalten von unmarkiertem BSA (a) und mit Cy3 markiertem BSA (b).
Unmarkiertes BSA (a) erzeugt zusätzlich zu der Mischbande bei 6min eine singuläre Bande bei Absorptionswellenlängen von 280nm und 215nm. Die Absorption bei 561nm, dem Absorptionsmaximum von Cy3, bleibt auf Basislinienniveau. Mit Cy3 markiertes BSA (b) erzeugt zusätzlich zu der Mischbande bei 6min eine singuläre Bande bei 30 min bei allen drei gemessenen Wellenlängen. Die Retentionszeiten von markiertem und unmarkiertem Protein unterscheiden sich nicht.

Die Retentionsfaktoren für die untersuchten Proteine und Fluorophore sind in **Tabelle 4.2** zusammengefasst.

Tabelle 4.2: Retentionsfaktoren von markiertem und unmarkiertem BSA und Mab02 resultierend aus RP-HPLC Pulsexperimenten
¹⁾ BSA: Rinderserumalbumin, Mab02: Monoklonaler Antikörper Nr. 2 der Fa. Böhrringer Ingelheim, vgl. **Tabelle 3.1**; ²⁾ Verwendete Fluorophore, vgl. **Tabelle 3.2**; ³⁾ Retentionsfaktor *unmarkiertes Protein / markiertes Protein* berechnet nach (53).

Protein ¹⁾	Fluorophor ²⁾	k' ³⁾	Protein ¹⁾	Fluorophor ²⁾	k' ³⁾
BSA	Cy3	24,3 / 24,4	Mab02	Cy3	30,5 / 30,3
BSA	Cy5	24,5 / 24,4	Mab02	Cy5	30,4/ 30,4
BSA	Bodipy FL	24,4 / 32,3	Mab02	Bodipy FL	30,4 / 30,6

4.2 Einfluss der Proteinmarkierung auf das Adsorptionsverhalten

Protein¹⁾	Fluorophor²⁾	k'³⁾	Protein¹⁾	Fluorophor²⁾	k'³⁾
BSA	Alexa 488	24,3 / 24,2	Mab02	Alexa 488	30,3 / 30,3

Das einzige System bei dem die Retentionsfaktoren von markiertem und unmarkiertem Protein nicht identisch waren, ist das System BSA – Bodipy FL. Bei diesem System wies das markierte Protein eine deutlich stärkere Retention in der Säule auf als das unmarkierte.

HI-FPLC Pulsexperimente

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen RP-HPLC Experimenten wurden bei den FPLC-Experimenten isokratische Bedingungen verwendet. In Analogie zu den oben erwähnten Experimenten wurde sowohl mit einem Proteingemisch aus unmarkierten und mit den Fluorophoren Cy3 und Cy5 markierten Proteinen gearbeitet. Für die Umrechnung der Absorptionssignale in Konzentrationen ebenso wie für die Korrektur der Absorption des Fluorophors bei 280 nm wurden Kalibrierkurven verwendet, die sich über den linearen Bereich hinaus erstreckten. Bei der Analyse der erhaltenen Chromatogramme konnte bezüglich des Retentionsvolumens kein Unterschied zwischen markierten und unmarkierten Proteinen festgestellt werden. Deutlich unterschieden sich allerdings die Massenbilanzen, welche sich mit zunehmender Konzentration an kosmotropem Agens für beide Proteinspezies verschlechterten, allerdings mit deutlich stärkerem Effekt für das markierte Protein. Dieser Effekt ließ sich durch eine Erhöhung der Fließgeschwindigkeit vermindern, die zudem eine Erhöhung des Retentionsvolumens beider Proteinspezies bedingt. In **Bild 4.3** sind beispielhaft zwei Chromatogramme dargestellt, die mit einem Gemisch aus mit Cy5 markiertem und unmarkiertem Mab02 aufgenommen wurden.

4 Ergebnisse

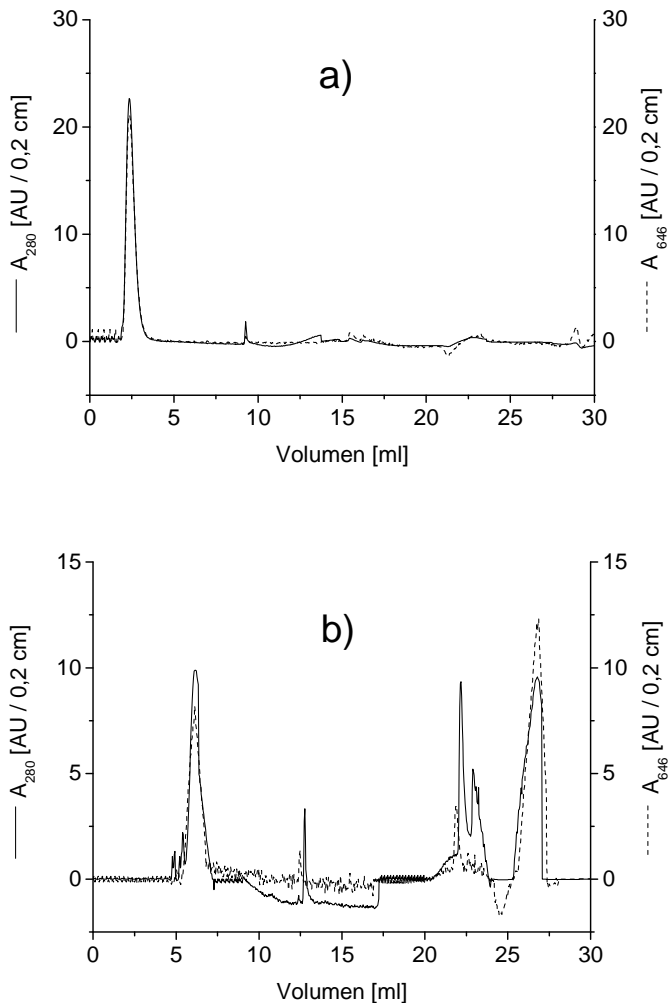


Bild 4.3: ÄKTA-FPLC Puls-experimente: Retentionsverhalten eines Gemisches von mit Cy5 markierten und unmarkierten Mab02 auf Butyl-Sepharose. a) Laufmittel ist 0,2 M Kaliumphosphat Puffer, pH 7, b) Laufmittel ist 0,2 M Kaliumphosphat Puffer bei pH7 mit 0,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Die jeweils analogen Chromatogramme mit ausschließlich unmarkiertem Mab02 weisen Banden bei 280 nm mit denselben Retentionszeiten wie die hier gezeigten auf. Das Signal bei 646 nm

4.2 Einfluss der Proteinmarkierung auf das Adsorptionsverhalten

verbleibt dort auf Basislinienniveau (Daten nicht gezeigt). Mit zunehmender Konzentration an kosmotropem Agens ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) erhöht sich das Retentionsvolumen der Bande wobei die Massenausbeute deutlich sinkt. Dieser Effekt ist bei nahezu gleich bleibendem Elutionsvolumen stärker für das markierte Immunglobulin ausgeprägt als für das unmarkierte. Die isokratische Elution erfolgte nach Pulsaufgabe gemäß **Tabelle 3.8** über ein Gesamtvolumen von 10ml. Alle weiteren Schritte von 10 – 30ml dienten der Säulenregeneration. In Chromatogramm b) sind neben der retardierten Hauptbande bei ca. 6ml noch zwei weitere Banden erkennbar: Die Doppelbande bei ca. 22 ml eluiert nach Spülung der Säule mit einer Lösung aus 1M NaOH und 1M NaCl ab 20ml und enthält hauptsächlich unmarkiertes Protein. Die Bande bei ca. 26ml eluiert nach Spülung mit einer 30% (v/v) 2-Propanol Lösung ab 25ml. Diese Bande enthält sowohl markiertes als auch unmarkiertes Protein.

Die Massenbilanzen bei 0,2 M Kaliumphosphat-Puffer sind mit 94%, bzw. 92% deutlich geschlossener als die mit einer Laufmittelkonzentration von 0,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ erhaltenen, wobei die erhaltenen Bandenflächen noch 56%, bzw. 39% der Referenzflächen entsprechen.

In **Tabelle 4.3** sind für einige der in **Tabelle 3.7** in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Puffersysteme die Retentionsfaktoren und Massenbilanzen für die Proteine BSA und Mab02, von denen der markierte Mengenanteil mit Cy 5 konjugiert war, dargestellt.

Tabelle 4.3: Retentionsfaktoren und Massenbilanzen für ausgewählte Systeme der HI-FPLC.

¹⁾ Verwendete Proteine: Rinderserumalbumin (BSA), humanisierter Antikörper 02 (Mab02), verwendetes Fluorophor: Cy5, verwendetes Adsorbens: Butyl-Sepharose FF; vgl. **Tabelle 3.1** ²⁾ Verwendete Puffersysteme: Phosphat Puffer, pH 7 ohne („0000“) oder mit 1 M NaCl („1000“), bzw. ohne („0000“) oder mit 350 / 700 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ („0350“ / „0700“), vgl. **Tabelle 3.4;** ³⁾ Fließgeschwindigkeit, mit welcher der Proteinpuls aufgegeben wurde und im Anschluss daran das Laufmittel; ⁴⁾ Volumen des Laufmittels welches nach der Aufgabe des Proteinpulses weiter auf die Säule aufgegeben wurde; ⁵⁾ Retentionsfaktor, links: unmarkiertes Protein, rechts: markiertes Protein, berechnet nach (53), das Retentionsvolumen unter nicht adsorbierenden Bedingungen bezieht sich auf die Bande, welche mit Milli-Q H_2O als Laufmittel gemessen wurde; ⁶⁾ Massenbilanz (MB): Prozentualer Anteil der Fläche der isokratisch retardierten Bande bezogen auf die nicht-retardierte Referenzbande mit Milli-Q H_2O als Laufmittel. Die Umrechnung der Extinktionswerte erfolgte anhand von Kalibrierkurven, die sich über den linearen Bereich hinaus erstreckten (vgl. Kap. 3.1.1 und 3.1.2). Diese Kurven dienten auch zur Ermittlung der Korrekturkoeffizienten, welche für die Korrektur des A_{280} Signals wegen der Absorption des Fluorophors bei dieser Wellenlänge gemäß (55) benötigt wurden.

Für alle hier dargestellten Systeme mit Ausnahme von Mab02 / AS0350 wurden auch Pulsexperimente mit Proben von komplett unmarkierten Proteinen durchgeführt. Die Retentionsfaktoren unterschieden

4 Ergebnisse

sich in allen Fällen um weniger als 1,5% von dem unmarkierten Mengenanteil der Proteingemische, welche die hier dargestellten Ergebnisse ergaben.

Protein¹⁾	Puffer²⁾	FR³⁾ [ml min ⁻¹]	V_{IK}⁴⁾ [ml]	k'⁵⁾ [1]	MB⁶⁾ [%]	MB_{NK}⁷⁾ [%]
BSA	NC0000	0,4	10	1,54 / 1,54	98 / 96	98 / 102
BSA	NC1000	0,4	10	5,38 / 5,39	84 / 72	92 / 78
BSA	AS0000	0,4	10	1,62 / 1,64	98 / 96	98 / 98
BSA	AS0700	0,4	10	10,19 / 10,18	62 / 45	65 / 52
Mab02	NC0000	0,4	10	1,81 / 1,80	96 / 95	99 / 100
Mab02	NC1000	0,4	10	6,22 / 6,23	77 / 65	87 / 81
Mab02	AS0000	0,4	10	1,95 / 1,95	94 / 92	97 / 97
Mab02	AS0350	0,4	10	8,03 / 8,02	80 / 78	88 / 83
Mab02	AS0700	0,4	10	12,35 / 12,36	56 / 39	70 / 55

Jungbauer et. al. erhielten für Pulsretentionsexperimente von BSA auf Butyl-Sepharose HP, was ein anderes Material für das Adsorbensrückgrat darstellt, bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von 0,75 M analoge Massenverluste wie in **Tabelle 4.3** dargestellt ([Jungbauer et al. 2005], Fig. 2 C). Der adsorbierte Proteinanteil wurde nach Wechsel des Laufmittels wie in dieser Arbeit eluiert (vgl. **Bild 4.3**) womit sich in beiden Arbeiten zwei Banden ergaben. Nach *Jungbauers* Postulat enthält die erste Bande natives Protein, die zweite partiell denaturiertes. Das Volumen an Laufmittel nach der Pulsaufgabe hatte in dieser Arbeit unabhängig von der Fließgeschwindigkeit keinen Einfluss auf die Massenbilanzen, d.h. es war nicht möglich, durch längeres Durchströmen der Säule mit Adsorptionspuffer zusätzliche Proteinbanden am Säulenausgang zu detektieren (Daten nicht gezeigt).

4.2.2 Sorptionsstudien im Shallow Bed Modus mittels direkter und indirekter Analyse

Bei den in Kapitel 3.2.3 dargestellten Experimenten wurden für alle in **Tabelle 3.9** dargestellten Protein-Puffersysteme qualitativ heterogene Ergebnisse erhalten. Dies galt für identische Mikroskopeinstellungen jeweils bezogen auf ein Protein –

4.2 Einfluss der Proteinmarkierung auf das Adsorptionsverhalten

Puffersystem. In **Bild 4.4** sind beispielhaft die beiden Extreme der unterschiedlichen Profiltypen dargestellt, die für die stärkste $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Salzkonzentration von 2 M und BSA unter Zugabe der gesamten Proteinmenge in einem Schritt erhalten wurden.

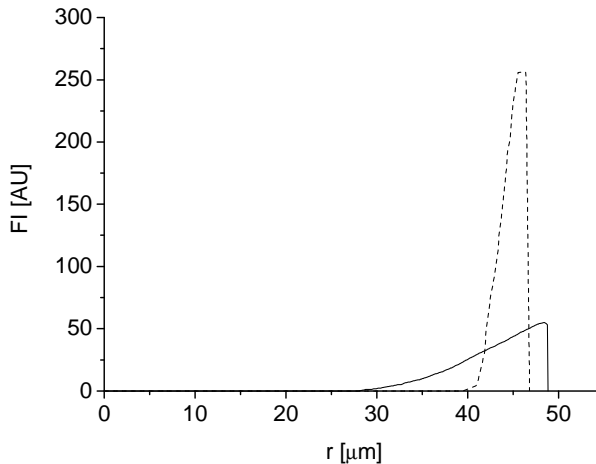


Bild 4.4: Direkte Analyse von Adsorptionsgleichgewichten im Miniatursäulenmodus mittels CLSM.

Zwei radial gemittelte, unkorrigierte Fluoreszenzintensitätsprofile Butyl-Sepharose FF beladen mit BSA / BSA-Cy5 in 0,1M KPi Puffer, 2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ im Adsorptionsgleichgewicht. Die Profile wurden mit dem CLSM in der Äquatorialebene der Partikel gemessen. Mikroskopeinstellungen: s.

Tabelle 3.13, Detector Gain: 670. Bei gleichen Mikroskopeinstellungen werden für dasselbe Ausgangssystem zwei völlig unterschiedliche Profile erhalten. Bei Experiment 1 (----) ist die Fluoreszenzintensität in den äußersten Schalen oberhalb des Messbereiches von 256 AU; die Radii beider Partikel wurden nicht auf 45μm normiert, der Partikel in Experiment 2 (—) hatte einen ca. 2μm größeren Radius. Alle gemessenen Partikel wurden unter dem Mikroskop so ausgewählt, dass alle gemessenen Werte für den Radius in einem Intervall zwischen 42 μm und 48 μm lagen. Bei den Kontrollversuchen mit nicht derivatisierten Partikeln wurden keine Fluoreszenzintensitätsprofile erhalten.

Im Folgenden werden nur diese beiden Extreme beschrieben und mit Kategorie 1 und 2 bezeichnet. Die Aussagen für die Extreme gelten in abgeschwächter Form für die Ergebnisse im mittleren Bereich.

4 Ergebnisse

Ergebnisse der Kategorie 1 zeigten stärker ausgeprägte konkave Profile mit einer hohen Fluoreszenzintensität in den äußeren Adsorbenschalen. Ergebnisse der Kategorie 2 zeigten schwächere Fluoreszenzintensitäten insgesamt bei einem gleichzeitig schwächer konkav ausgeprägten Profil. Bei jedem Experiment dieses Ansatzes wurden pro analysiertes System zwei Negativkontrollen gemessen: Bei Negativkontrolle 1 wurde die leere Fließzelle ohne Adsorbentien von der Proteinlösung durchströmt, bei Negativkontrolle 2 die mit nicht derivatisierter Sepharose gepackte Fließzelle.

In **Tabelle 4.4** sind die Ergebnisse für zwei untersuchte Systeme, BSA und Butyl-Sepharose in den Ammoniumsulfatpuffern der höchsten und niedrigsten Konzentration, beispielhaft aufgelistet.

Tabelle 4.4: Massenbilanzen und D/P-Verhältnisse aus der Flüssigphasenanalyse im Miniaturbettmodus; untersuchtes System: BSA, Butyl-Sepharose FF, 0,1M Kalium-Phosphat Puffer, 2M (NH₄)₂SO₄.

¹⁾ BSA: Rinderserumalbumin, Ausgangskonzentration: 1,5 mg ml⁻¹ ²⁾ Verwendete Puffer: 0,1 M KPi, 0,35 M (AS0350) / 2 M (AS2000) (NH₄)₂SO₄, vgl. **Tabelle 3.4**; ³⁾ Korrespondierende Ergebniskategorie zu den in **Bild 4.4** dargestellten FI-Profilen (*) aus der CLSM Analyse ⁴⁾ Mengenverhältnis *markiertes Protein / Gesamtprotein*, berechnet nach (52), vor und nach Einstellung des Adsorptionsgleichgewichts, die Flüssigphasenwerte korrespondieren mit den in **Bild 4.4** dargestellten FI-Profilen aus der CLSM Analyse; ⁵⁾ Massenbilanz der Messung mit regulären, funktionalisierten Adsorbentien, dargestellt ist der prozentuale Anteil der in der Flüssigkeit verbliebenen Gesamtproteinmenge nach 90 minütiger Kreislaufführung der Flüssigphase; ⁶⁾ Massenbilanzen der korrespondierenden Negativkontrollen: 1 - Miniatursäulenbettkammer ohne Adsorbentien, 2 - Kammer gepackt mit nicht derivatisierten Adsorbentien; ermittelt wurde das Verhältnis der Gesamtproteinlösungen vor und nach der 90 minütigen Kreislaufführung der Flüssigphase.

Protein ¹⁾	Puffer ²⁾	Kategorie ³⁾	D/P _{vor} ⁴⁾	D/P _{nach} ⁴⁾	MB ⁵⁾	MB _{NK1} ⁶⁾	MB _{NK2} ⁶⁾
			[1]	[1]	[%]	[%]	[%]
BSA	AS0350	1	0,08	0,03	92	97	95
BSA	AS0350	2	0,08	0,02	72	84	82
BSA	AS2000	1 ^{*)}	0,08	0,01	74	95	95
BSA	AS2000	2 ^{*)}	0,08	0,00	52	78	75

Bei beiden Ergebnis-Kategorien hatte sich das Mengenverhältnis von markiertem Protein zu Gesamtprotein in der Flüssigphasenanalyse nach Einstellung des

4.2 Einfluss der Proteinmarkierung auf das Adsorptionsverhalten

Adsorptionsgleichgewichtes deutlich zu Gunsten des unmarkierten Proteins verschoben, d.h. das mehr markierte Protein als unmarkiertes Protein adsorbierte. Für Ergebnisse der Kategorie 1 zeigten sich vergleichsweise geringe Massenverluste in den Negativkontrollen. Die Werte der beiden Negativkontrollen untereinander unterschieden sich nur gering, die Unterschiede lagen im einstelligen Prozentbereich.

Für Ergebnisse der Kategorie 2 waren die Konzentrationsabnahmen in der Proteinlösung bei den regulären Messungen wesentlich stärker als bei Kategorie 1. Dies schlug sich auch in wesentlich höheren Massenverlusten bei beiden Negativkontrollen nieder. Die Unterschiede in den Massenverlusten zwischen den beiden Negativkontrollen lagen ebenfalls im einstelligen Prozentbereich, so dass der überwiegende Anteil an den Massenverlusten durch unspezifische Bindung an den Apparaturen und nicht an den nicht-funktionalisierten Adsorbentien erfolgte.

Bei der zweiten Negativkontrolle wurden die nicht derivatisierten Sepharose-Partikel zusätzlich direkt mit dem CLSM analysiert. Die gemessenen Werte lagen oberhalb des Grundrauschens der Messsignale. Allerdings ergaben sich bei gleichen Mikroskopeinstellungen signalschwache Profile mit sehr heterogenen und für ein System nicht reproduzierbaren konkaven Ausprägungen (Daten nicht gezeigt).

Die erhaltenen Ergebnisse werden zweigeteilt diskutiert:

Mit Bezug auf die Intention des Experiments wird das Referenzexperiment in Kapitel 5.2.2 diskutiert, bei dem von *Soderquist et. al.* durchgeführte Vergleich von zwei unterschiedlichen Beladungsmethoden der Adsorbentien zu Kapazitätsunterschieden führte [Soderquist et al. 1980].

Die allgemeinen Aussagen aus dem Vergleich der Negativkontrollen mit den regulären Messungen werden in Kapitel 5.2.1 diskutiert.

4 Ergebnisse

4.2.3 Sorptionsstudien im Finite Bath Modus mittels direkter und indirekter Analyse

Finite Bath HIC-Experimente

Bei den Finite Bath Experimenten wurden qualitativ drei verschiedene Kategorien von Ergebnissen für dasselbe Ausgangssystem erhalten. Zusätzlich zu den beiden Ergebniskategorien, die den Ergebnissen aus den Experimenten im Miniatursäulenmodus (Kapitel 4.2.2) glichen, wurde noch eine dritte Kategorie erhalten. In **Bild 4.5** ist jeweils ein Beispiel für eine Ergebnis-Kategorie dargestellt, die für die stärkste $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Salzkonzentration von 2 M erhalten wurden.

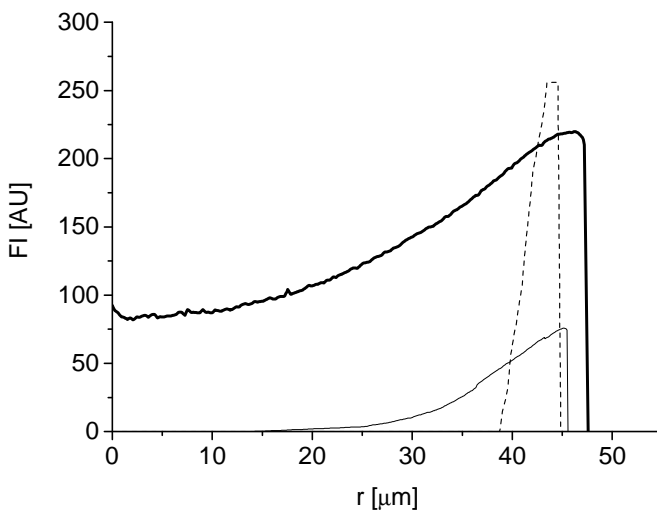


Bild 4.5: Direkte Analyse von Adsorptionsgleichgewichten im Finite Bath Modus mit der CLSM. Drei radial gemittelte, unkorrigierte Fluoreszenzintensitätsprofile von Butyl-Sepharose FF beladen mit BSA / BSA-Cy5 in 0,1M KPi Puffer, 2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ im Adsorptionsgleichgewicht. Die Profile wurden mit dem CLSM in der Äquatorialebene der Partikel gemessen. Mikroskopeinstellungen: s. **Tabelle 3.13**, Detector Gain: 690.

4.2 Einfluss der Proteinmarkierung auf das Adsorptionsverhalten

Bei gleichen Mikroskopeinstellungen wurden für dasselbe Ausgangssystem drei völlig unterschiedliche Profile erhalten. Bei Ergebnissen der Kategorie 1 (----) hatten die Fluoreszenzintensitätsprofile die stärkste Ausprägung, in diesem Fall ist die Fluoreszenzintensität in den äußersten Schalen oberhalb des Messbereiches von 256 AU; die Radii aller drei Partikel wurden nicht auf 45 µm normiert, sondern deren absolute Größen beibehalten. Alle Partikel wurden unter dem Mikroskop so ausgewählt, dass alle gemessenen Werte für den Radius in einem Intervall zwischen 44 µm und 48 µm lagen. Bei den Kontrollversuchen mit nicht derivatisierten Partikeln wurden keine Fluoreszenzintensitätsprofile erhalten.

Ergebnisse der Kategorie 1 zeigten analog zu den Ergebnissen im Miniaturbettmodus stärker ausgeprägte konkave Profile mit einer hohen Fluoreszenzintensität in den äußeren Adsorbenschalen. Ergebnisse der Kategorie 2 zeigten ebenfalls analog schwächere Fluoreszenzintensitäten insgesamt bei einem gleichzeitig schwächer konkav ausgeprägten Profil.

Bei jedem Experiment dieses Ansatzes wurden pro analysiertem System zwei Negativkontrollen gemessen: Bei der ersten Negativkontrolle wurde das untersuchte Protein-Puffergemisch in einem leeren Gefäß der $96 \times 1,2$ ml fassenden Mikrotiterplatte analog zu den übrigen Proben inkubiert. Bei der zweiten Negativkontrolle bestand der Partikelplaque aus nicht derivatisierter Sepharose, d.h. Material mit Hydroxylgruppen auf der Oberfläche anstatt von funktionalen Liganden.

In **Tabelle 4.5** sind die Ergebnisse für dieselben untersuchten Systeme beispielhaft aufgelistet, die auch bei den Experimenten im Miniatursäulenmodus in Kapitel 4.2.2 dargestellt wurden.

Tabelle 4.5: Massenbilanzen und D/P-Verhältnisse aus der Flüssigphasenanalyse im Finite Bath Modus; untersuchtes System: BSA, Butyl-Sepharose FF, 0,1M Kalium-Phosphat Puffer, 2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

¹⁾ BSA: Rinderserumalbumin, Anfangskonzentration: $1,5 \text{ mg ml}^{-1}$ ²⁾ Verwendete Puffer: 0,1 M KPi, 0,35 M (AS0350) / 2 M (AS2000) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, vgl. **Tabelle 3.4**; ³⁾ Korrespondierende Ergebniskategorie zu den in **Tabelle 4.4** dargestellten FI-Profilen (*) aus der CLSM Analyse; ⁴⁾ Mengenverhältnis *markiertes Protein / Gesamtprotein* in der Flüssigphase vor und nach Einstellung des Adsorptionsgleichgewichts, berechnet nach (52), die Flüssigphasenwerte korrespondieren mit den in **Bild 4.5** dargestellten Profilen; ⁵⁾ Massenbilanzen der Negativkontrolle 1, $96 \times 1,2$ ml Mikrotiterplattengefäß ohne Adsorbentien, sowie der Negativkontrolle 2, $96 \times 1,2$ ml Mikrotiterplattengefäß mit nicht derivatisierten Adsorbensplaques. Ermittelt wurde das Konzentrationsverhältnis der Proteinlösungen vor und nach der 90 minütigen Inkubation. Der prozentuale Anteil der in der Flüssigkeit verbliebenen Proteinmenge ist dargestellt.

4 Ergebnisse

Pro- tein ¹⁾	Puffer ²⁾	Kate- gorie ³⁾	D/P _{vor} 4)	D/P _{nach} 4)	MB 5)	MB _{NK1} 5)	MB _{NK2} 5)
			[1]	[1]	[%]	[%]	[%]
BSA	AS0350	1	0,08	0,04	93	98	98
BSA	AS0350	2	0,08	0,02	81	86	84
BSA	AS0350	3	0,08	0,08	94	98	97
BSA	AS2000	1 ^{*)}	0,08	0,01	74	96	95
BSA	AS2000	2 ^{*)}	0,08	0,01	68	79	76
BSA	AS2000	3 ^{*)}	0,08	0,07	75	97	96

Bei den Ergebnis-Kategorien 1 und 2 hatte sich das Mengenverhältnis von markiertem Protein zu Gesamtprotein in der Flüssigphasenanalyse nach Einstellung des Adsorptionsgleichgewichtes deutlich zu Gunsten des unmarkierten Proteins verschoben, bei Kategorie 3 blieb es nahezu unverändert.

Die beiden Ergebniskategorien 1 und 2 zeigten dieselben Trends wie bei den Shallow Bed Experimenten, die im vorigen Kapitel 4.2.2 dargestellt wurden. Auftretende Massenverluste bei den Negativkontrollen waren nicht durch die nicht-funktionalisierten Adsorbentien bedingt. Die Massenverluste bei den beiden Negativkontrollen der Kategorie 2 vielen insgesamt deutlich geringer aus als bei den Shallow Bed Experimenten.

Bei der Negativkontrolle 2 wurden die nicht derivatisierten Sepharose-Partikel ebenfalls direkt mit dem CLSM analysiert. Die gemessenen Werte lagen allerdings innerhalb des Grundrauschens der Messsignale (Daten nicht gezeigt).

In situ Markierungsexperimente mit beladenen Adsorbentien

Bei den In Situ Markierungsexperimenten wurden die untersuchten Adsorbentien im Finite Bath Modus allen Zyklen eines Chromatographie-Schrittes, Adsorption, Waschen und Elution, unterzogen. Dabei wurden die mit Cy5 markierten Proteine im adsorbierten Zustand noch mit einem weiteren Fluorophor, Alexa 488, in situ, d.h. auf dem Adsorbens, nochmals markiert. Die Kopplungsreaktion des zweiten Fluorophors ist dabei mit der des ersten Fluorophors, die in Kapitel 3.2.1 beschrieben wurde, identisch. Von den in **Bild 3.8** schematisch dargestellten

4.2 Einfluss der Proteinmarkierung auf das Adsorptionsverhalten

direkten Partikelanalysen des ersten Adsorptionsschritts, der In Situ Markierungsreaktion, aller drei Waschschrte sowie aller drei Elutionsschritte sind in **Bild 4.6** lediglich die FI-Profile nach der In Situ Markierungsreaktion für BSA und Mab02 auf Butyl-Sepharose FF dargestellt, die unter einer Salzkonzentration von 0,7 M, bzw. 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ an die Adsorbentien adsorbierten.

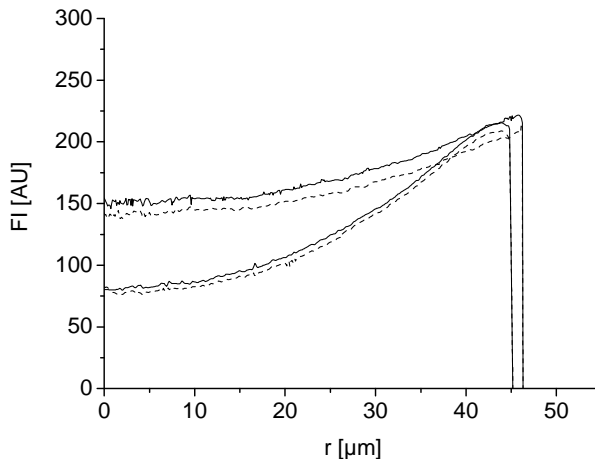


Bild 4.6: Direkte Analyse von In-Situ Markierungsexperimenten mit dem CLSM.

Radial gemittelte, nicht-normierte FI Profile von Butyl-Sepharose FF. Mikroskopeinstellungen: s.

Tabelle 3.13: Schwächer konkave Profile: Mab02, 0,1M KPi , pH 7 bei RT, 0,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Detector Gain: 690; stärker konkave Profile: BSA, 0,1M KPi , pH 7 bei RT, 2,0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Detector Gain: 700. Für beide Proteine sind sowohl die FI-Profile aus anfänglich mit Cy5 markiertem Protein (—) als auch die aus der in-situ Markierung mit Alexa488 erhaltenen FI-Profile (---) dargestellt.

Für sämtliche untersuchten chromatographischen Systeme glichen sich die FI-Profile aus Anfangs- und In Situ Markierungsreaktion, wobei die FI Signale von Alexa 488, dem Fluorophor mit dem kürzer welligen Emissionssignal die Signalintensität stets eine 4 - 10% geringere Intensität hatten.

4 Ergebnisse

Die zu jedem Inkubationsschritt zugehörige Flüssigphasenanalyse, die mittels GAC vorgenommen wurde, ergab ebenfalls keine Unterschiede zwischen Anfangs- und In Situ Markierungsreaktion. In **Bild 4.7** sind beispielhaft die Werte für das in **Bild 4.6** dargestellte System Mab02 / Butyl-Sepharose FF / 0,1M KP_i , 0,7M $(NH_4)_2SO_4$ gezeigt.

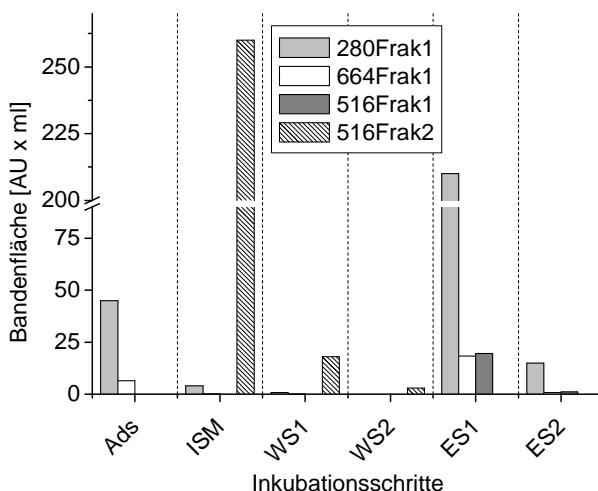


Bild 4.7: Flüssigphasenanalyse der In situ Markierungsexperimente von Mab02 auf Butyl-Sepharose FF in 0,1 M KP_i , 0,7 M $(NH_4)_2SO_4$ mittels GAC.

Bandenflächen der Inkubationsschritte Adsorption (Ads), In situ Markierung (ISM), Waschschrte 1 und 2 (WS1, WS1) und Elutionsschritte 1 und 2 (ES1, ES2) sind aufgetragen. Waschschrte 3 und Elutionsschrte 3 sind nicht gezeigt, da diese keine oder vernachlässigbar geringe Bandenflächen aufwiesen. Mab02 eluierte bedingt durch seine Größe als erstes in der Fraktion 1 (Frak1) von der Säule. Das niedermolekulare Fluorophor später in der Fraktion 2 (Frak2). Die Unterscheidung zwischen den unterschiedlichen Markierungstypen konnte durch simultane Messung der Absorptionsmaxima von Proteinen allgemein sowie der beiden Fluorophore erfolgen. Nach erfolger in Situ Markierung des bereits Cy5 markierten Proteins mit Alexa 488 wird in den Waschschrten lediglich ungebundenes Alexa und eine geringe Menge nicht adsorbiertes Protein abgewaschen. Bei den folgenden Elutionen sind die Bandenflächen für beide Fluorophore nahezu gleich stark.

Analog zu den in **Bild 4.6** dargestellten FI-Profilen aus der direkten Analyse konnten auch bei der indirekten Analyse keine Unterschiede zwischen anfänglich

4.2 Einfluss der Proteinmarkierung auf das Adsorptionsverhalten

und in situ markierten Proteinen festgestellt werden. Die während der Elutionsschritte von den Adsorbentien gelösten Proteine haben zu nahezu identischen Anteilen Cy5 markiertes, sowie Alexa 488 markiertes Protein. Dies war für alle untersuchten Proteine, Puffer und Adsorbentien der Fall (Daten nicht gezeigt).

4.3 Simulation der intrapartikulären Proteinkonzentration

Zur Vorhersage der intrapartikulären Proteinkonzentration wurden diese mittels eines Einzelpartikelmodells [Susanto et al. 2007] simuliert und mit den erhaltenen experimentellen Daten verglichen. Die in den Kapiteln 4.3.1 und 4.3.2 beschriebenen Parameteranpassungen und Evaluationen der Porendiffusionsmodelle wurden für vier chromatographische Systeme durchgeführt:

- BSA / 0,1 M KPi , 0,7 M (System 1) sowie 2 M (System 2) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ / Phenyl-Sepharose FF high substitution
- Mab02 / 0,1 M KPi , 0,35 M (System 3) sowie 0,7 M (System 4) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ / Butyl-Sepharose FF.

4.3.1 Einfache Porendiffusionsbehinderung

Beispielhaft sind in den Kapiteln 4.3.1 und 4.3.2 die Ergebnisse für das System Mab02 / Butyl-Sepharose FF / 0,1 M KPi , 0,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dargestellt.

Bei der reinen Flüssigphasenanalyse der Isothermen-Daten wurden die Parameter der zeitunabhängigen Gleichung nach Langmuir, die in (3) eingeführt wurde, an die Daten der Adsorptionsisothermen angepasst. **Bild 4.8** zeigt den Vergleich der Simulationsergebnisse mit den Messdaten für die extrapartikuläre Flüssigphase.

4 Ergebnisse

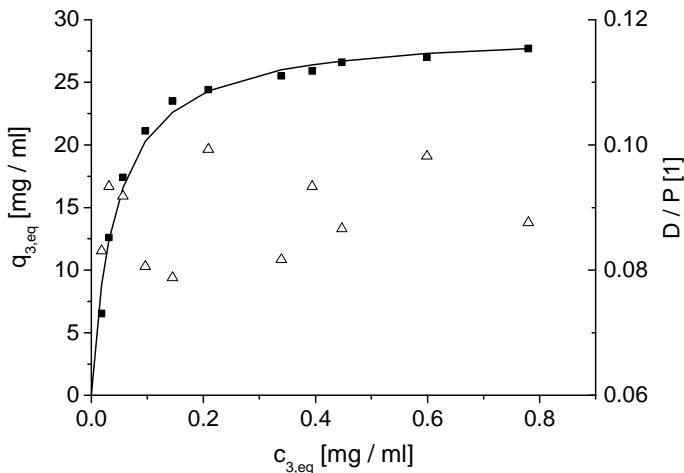


Bild 4.8: Isothermendaten des Systems Mab02 / Butyl-Sepharose FF / 0,1 M KP₁, 0,7 M (NH₄)₂SO₄.

Die experimentell erhaltenen Daten (■) sind im Vergleich zu den Simulationsergebnissen (—) dargestellt. Aufgetragen ist die Adsorptionskapazität $q_{3,eq}$, welche die Gesamtproteinkonzentration pro Adsorbensvolumen im Adsorptionsgleichgewicht beschreibt über der korrespondierenden Gesamtproteinkonzentration in der Flüssigphase $c_{3,eq}$. Für die maximale Kapazität q_{max} ergab sich ein Wert von 0,18 mM / 27,5 mg ml⁻¹, für die Affinitätskonstante K_a ergab sich ein Wert von 3073 mM⁻¹ / 21 ml mg⁻¹. Zusätzlich ist auf der rechten Ordinate das Mengenverhältnis aus markiertem Protein zu Gesamtprotein (D/P; △) aufgetragen. Dieses schwankte ohne erkennbaren Trend in einem Wertebereich von 0,08 und 0,11.

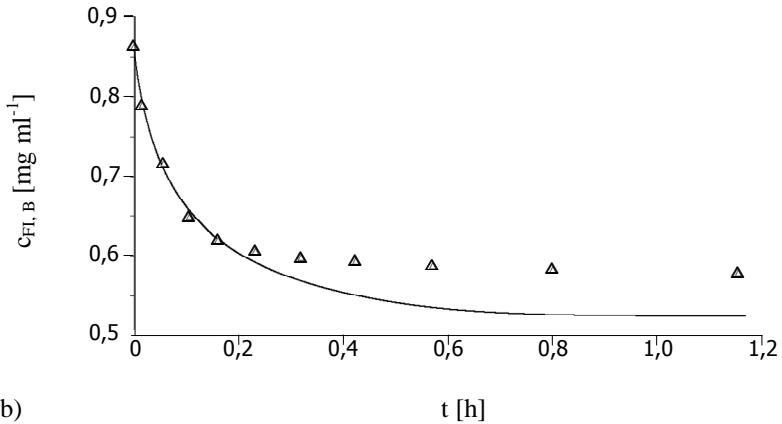
Für die maximale Kapazität q_{max} ergab sich ein Wert von 0,18 mM / 27,5 mg ml⁻¹, für die Affinitätskonstante K_a ergab sich ein Wert von 3073 mM⁻¹ / 21 ml mg⁻¹. Das Mengenverhältnis aus markiertem Protein zu Gesamtprotein (D/P) schwankte ohne erkennbaren Trend in einem Wertebereich von 0,08 und 0,11.

Mit Kenntnis dieser beiden Parameter konnten nun die Modellparameter γ , k_{ads} und q_{max} in dem in Kapitel 2.2.3 dargestellten DAE System angepasst werden. Die Anpassung erfolgte mit der MATLAB Funktion *fminsearch* nach dem Prinzip der kleinsten Fehlerquadrate. **Bild 4.9** zeigt für die Adsorptionskinetik dieses chromatographischen Systems den Konzentrationsverlauf in der extrapartikulären

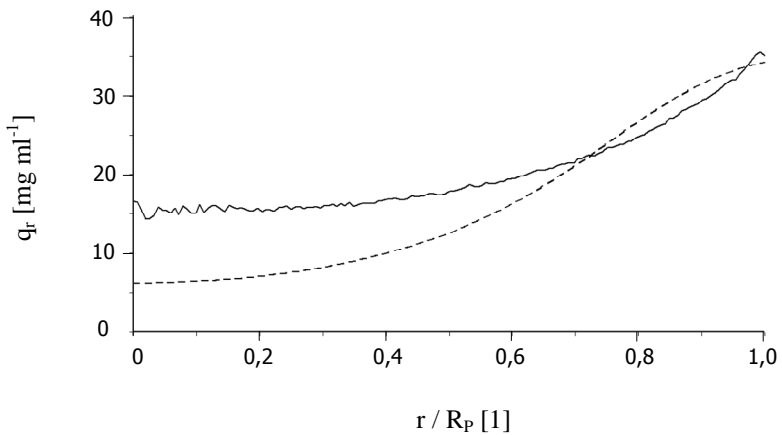
4.3 Simulation der intrapartikulären Proteinkonzentration

Flüssigkeit sowie intrapartikuläre Konzentrationsprofile für drei Zeitpunkte von 4, 19 und 70 min.

a)

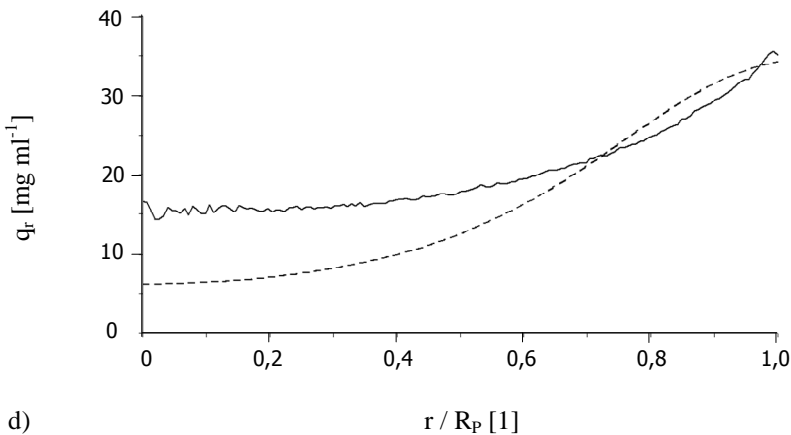


b)



4 Ergebnisse

c)



d)

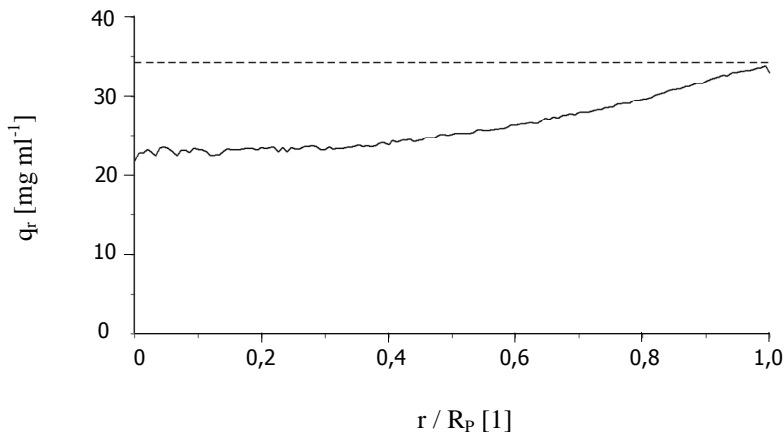


Bild 4.9: Adsorptionskinetiken des Systems Mab02 / Butyl-Sepharose FF / 0,1 M KP_i , 0,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und Simulationsergebnisse unter Verwendung des einfachen effektiven Porendiffusionskoeffizienten.

Der einfache effektive Porendiffusionskoeffizient wird maßgeblich durch eine adsorbierte Proteinspezies beeinflusst, wie in (18) dargestellt.

a) Proteinkonzentration in der extapartikulären Flüssigkeit aufgetragen über der Zeit. Ausgangskonzentration: $0,86 \text{ mg ml}^{-1}$. Die experimentell erhaltenen Daten (\triangle) sind im Vergleich zu den Simulationsergebnissen (—) dargestellt. Das Mengenverhältnis von Fluorophor zu Gesamtprotein (D/P) schwankte ohne erkennbaren Trend zwischen Werten von 0,10 und 0,11.

b – d) Intrapartikuläre Konzentrationsprofile innerhalb eines radial normierten Butyl-Sepharose

4.3 Simulation der intrapartikulären Proteinkonzentration

Referenzpartikels mit einem Radius zwischen 43 – 48 μm (vgl. Kapitel 3.2.4) zu verschiedenen Zeitpunkten: (b) $t = 0,06 \text{ h}$, (c) $t = 0,32 \text{ h}$, (d) $t = 1,15 \text{ h}$.

Für die anzupassenden Parameter wurden folgende Werte erhalten: $q_{\text{max}} = 0,26 \text{ mM}$, $k_{\text{ads}} = 1,29 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, $\gamma = 20,64 \text{ mM}^{-1}$

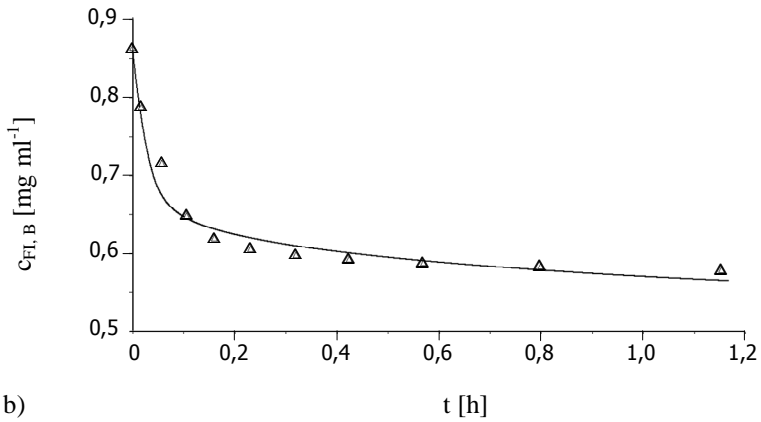
Für die Parameteranpassung wurden die in **Tabelle 4.6** dargestellten Werte erhalten. Die aus der Datenanpassung der Kinetikdaten resultierende Maximalkapazität der Adsorbentien q_{max} ergab einen deutlich höheren Wert als der, der durch die reine Flüssigphasenanalyse gemessen wurde. Die Messdaten in der extrapartikulären Flüssigkeit konnten lediglich zu Anfang, in etwa bis zu einem Zeitpunkt von 0,2 dez h / 12 min korrekt mit dem Modell unter Verwendung des einfachen effektiven Porendiffusionskoeffizienten aus (18) beschrieben werden, danach war die gemessene Abnahme der Proteinkonzentration wesentlich niedriger als die simulierte. Folglich war die gemessene Beladung in den inneren Schalen des Partikels wesentlich niedriger als durch die Simulation beschrieben. Bei Erreichen des Adsorptionsgleichgewichtes nach ca. 70 min wurde durch das Modell ein homogen beladenes Adsorbenspartikel simuliert, wohingegen die Messungen ein inhomogen gesättigtes Partikel mit einem konkaven Konzentrationsprofil ergaben.

4.3.2 Erweiterte Porendiffusionsbehinderung

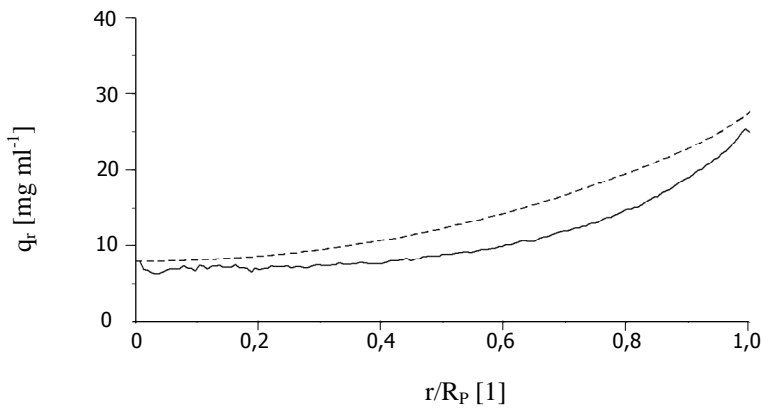
Unter Verwendung des erweiterten effektiven Porendiffusionskoeffizienten wurde die Parameteranpassung erneut durchgeführt. **Bild 4.10** zeigt die erhaltenen Resultate für die Adsorptionskinetik dieses chromatographischen Systems. Analog zu **Bild 4.9** sind der Konzentrationsverlauf in der extrapartikulären Flüssigkeit sowie intrapartikuläre Konzentrationsprofile für drei Zeitpunkte von 4, 19 und 70 min dargestellt.

4 Ergebnisse

a)



b)



4.3 Simulation der intrapartikulären Proteinkonzentration

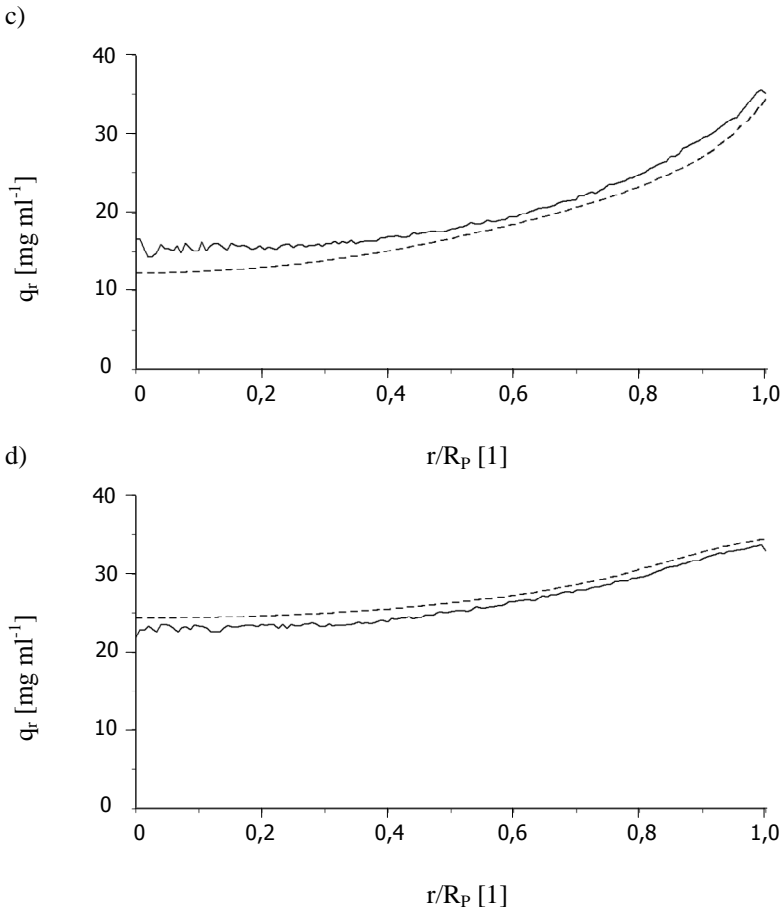


Bild 4.10: Adsorptionskinetiken des Systems Mab02 / Butyl-Sepharose FF / 0,1 M KPi , 0,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und Simulationsergebnisse unter Verwendung der erweiterten effektiven Porendiffusionskoeffizienten.

Der erweiterte effektive Porendiffusionskoeffizient wird durch zwei unterschiedliche adsorbierte Proteinspezies beeinflusst, s. (21). Das Mengenverhältnis von Fluorophor zu Gesamtprotein (D/P) schwankte ohne erkennbaren Trend zwischen Werten von 0,10 und 0,11.

a) Proteinkonzentration in der extrapartikulären Flüssigkeit aufgetragen über der Zeit. Ausgangskonzentration: $0,86 \text{ mg ml}^{-1}$. Die experimentell erhaltenen Daten (\triangle) sind im Vergleich zu den Simulations-ergebnissen (—) dargestellt.

b – d) Intrapartikuläre Konzentrationsprofile innerhalb eines radial normierten Butyl-Sepharose Referenzpartikels mit einem Radius zwischen $43 - 48 \mu\text{m}$ (vgl. Kapitel 3.2.4) zu verschiedenen

4 Ergebnisse

Zeitpunkten: (b) $t = 0,06$ h, (c) $t = 0,32$ h, (d) $t = 1,15$ h.

Für die anzupassenden Parameter wurden folgende Werte erhalten: $q_{\max} = 0,26$ mM, $k_{\text{ads}} = 1,29 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, $\gamma_{\text{nativ}} = 7808,11 \text{ mM}^{-1}$, $\gamma_{\text{entfaltet}} = 3,71 \text{ mM}^{-1}$, $n = 15,61$

Im Gegensatz zu den in Kapitel 4.3.1 vorgestellten Ergebnissen können hier sowohl die intrapartikulären als auch die extrapartikulären Konzentrationsverläufe für alle Zeitpunkte angemessen durch das Modell abgebildet werden. Lediglich die Profile, in denen der Profilverlauf in der Partikelmitte nahezu parallel zu der Abzisse ist und in den äußeren Adsorbenschalen dann stark ansteigend ist, können in ihrer ‚Bivalenz‘ nicht voll erfasst werden. Anstatt des experimentell sichtbaren deutlichen Übergangs zwischen den beiden ‚Bereichen‘ verläuft das modellierte Profil einheitlicher und überschätzt damit die Proteinkonzentration im Übergangsbereich. In **Tabelle 4.6** sind die Parametersätze, welche unter Verwendung der einfachen und erweiterten Porendiffusionsbehinderung errechnet wurden, zum Vergleich dargestellt.

Tabelle 4.6: Vergleich der für das System Mab02 / Butyl-Sepharose FF / 0,1 M KP_1 , 0,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ erhaltenen Parameter unter Verwendung von einfacher und erweiterter Porendiffusionsbehinderung.

¹⁾ Maximalkapazität und Adsorptionsrate nach *Langmuir*, dargestellt in (1); ²⁾ Hinderungsparameter des einfachen effektiven Porendiffusionskoeffizienten, unter Berücksichtigung einer adsorbierten Proteinspezies; ³⁾ Hinderungsparameter der nativen und entfalteten Proteinspezies des erweiterten effektiven Porendiffusionskoeffizienten; ⁴⁾ Exponent aus (19), beschreibt den Mengenanteil an nativem Protein in Abhängigkeit von der bereits erfolgten Beladung; ⁵⁾ Regressionsgüte

Modell	$q_{\max}^{1)}$ [mM]	$k_{\text{ads}}^{1)}$ [mM ⁻¹ s ⁻¹]	$\gamma^{2)}$ [mM ⁻¹]	$\gamma_{\text{nativ}}^{3)}$ [mM ⁻¹]	$\gamma_{\text{entfaltet}}^{3)}$ [mM ⁻¹]	$n^{4)}$ [1]	$R^{2\ 5)}$ [1]
(18)	0,26	1,29	20,64	n.v.	n.v.	n.v.	0,82
(21)	0,26	1,29	n.v.	7808,11	3,71	15,61	0,99

Bei gleicher Maximalkapazität der Adsorbentien und gleicher Adsorptionsrate unterscheiden sich die beiden Hinderungsparameter der in (21) dargestellten erweiterten Porendiffusionsbehinderung um ein, bzw. zwei Zehnerpotenzen von dem Hinderungsparameter der einfachen Porendiffusionsbehinderung aus (18). Bei Betrachtung der erweiterten Porendiffusionsbehinderung ist der Hinderungsparameter des nativen Proteins um den Faktor 2000 größer als der des entfalteten Proteins.

4.4 Einfluss chromatographischer Prozessparameter auf die Adsorptionseigenschaften der untersuchten HIC-Systeme

Die in den vorangegangenen Kapiteln dargestellten Experimente dienten der Auswahl geeigneter chromatographischer Systeme und deren bestmöglicher Charakterisierung mit den vorhandenen Analysemethoden.

Durch Variation diverser relevanter Parameter für die HIC, der Proteingröße und Proteinhydrophobizität, der Salzart und Salzkonzentration und letztendlich der Ligandenart und Ligandendichte sollte deren Einfluss auf den intrapartikulären Proteintransport untersucht werden. Alle in **Tabelle 3.12** dargestellten Systeme wurden deshalb wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben analysiert und die erhaltenen Daten aus der Flüssig- und Festphasenanalyse an das in Kapitel 4.3.2 dargestellte erweiterte Porendiffusionsmodell angepasst.

Als Maß für die Beschreibbarkeit eines Datensatzes durch das Modell wurde eine Regressionsgüte $\geq 0,85$ bei der Anpassung der Flüssigphasendaten sowohl aus den Isothermen- als auch aus den Kinetikmessungen definiert, wobei die dadurch erhaltenen simulierten intrapartikulären Konzentrationsprofile bei keinem radialen Koordinatepunkt zwischen $0,2 < R_p < 1$ um mehr als 25% von den gemessenen Profilverläufen abweichen durften. Die Adsorbenschalen von $0 - 0,2 r/R_p$ wurden nicht berücksichtigt, da ein konzentrationsunabhängiges Grundrauschen vorlag und die Standardabweichung des Signals zur Partikelmitte hin aufgrund von weniger Datenpunkten für die radiale Mittelung des gemessenen Profils höher ist. Durch diesen Effekt sind die meisten Profile von Systemen mit schwacher Beladung aufgrund der niedrigen Absolutwerte betroffen, obwohl sich die Bildqualität dieser Daten nicht von den Systemen mit höherer Beladung unterscheidet.

Für das Adsorbens Octyl-Sepharose konnte kein System erhalten werden, das diesen Kriterien genügte. Für Butyl-Sepharose gelang lediglich die Charakterisierung von BSA in allen vier NaCl Puffern und von Mab02 in beiden $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Puffern. Lediglich für Phenyl-Sepharose in beiden Ligandendichten konnte nahezu das gesamte Protein- und Pufferspektrum charakterisiert werden. Die Ausnahme bildet Mab02 in beiden $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Puffern. In **Tabelle 6.1** sind die

4 Ergebnisse

erhaltenen Modellparameter mit den zugehörigen Regressionsgüten dargestellt. Als Referenzwerte für die Ergebnisse des erweiterten Porendiffusionsmodells sind zudem die Adsorptionsraten dargestellt, die durch direkte Anpassung der Flüssigphasendaten an die zeitabhängige Form des Langmuir-Modells erhalten wurden.

4.4.1 Kosmotrope Salze: Position in der Hofmeister-Reihe und Konzentrationseffekte von NaCl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Im folgenden Unterkapitel sind beispielhaft die Ergebnisse für das Protein-Adsorbens-Paar BSA-Phenyl-Sepharose FF low sub dargestellt. Als Adsorptionspuffer fanden beide Phosphat-Puffersysteme mit den beiden jeweiligen Extremwerten an Salzkonzentrationen, 0,35 M und 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sowie 1,25 M und 5 M NaCl Verwendung.

Flüssigphasenanalyse

In **Bild 4.11** sind sowohl die Adsorptionsisothermen als auch die Adsorptionskinetiken für die vier zuvor beschriebenen chromatographischen Systeme dargestellt.

4.4 Einfluss chromatographischer Prozessparameter auf HIC Systeme

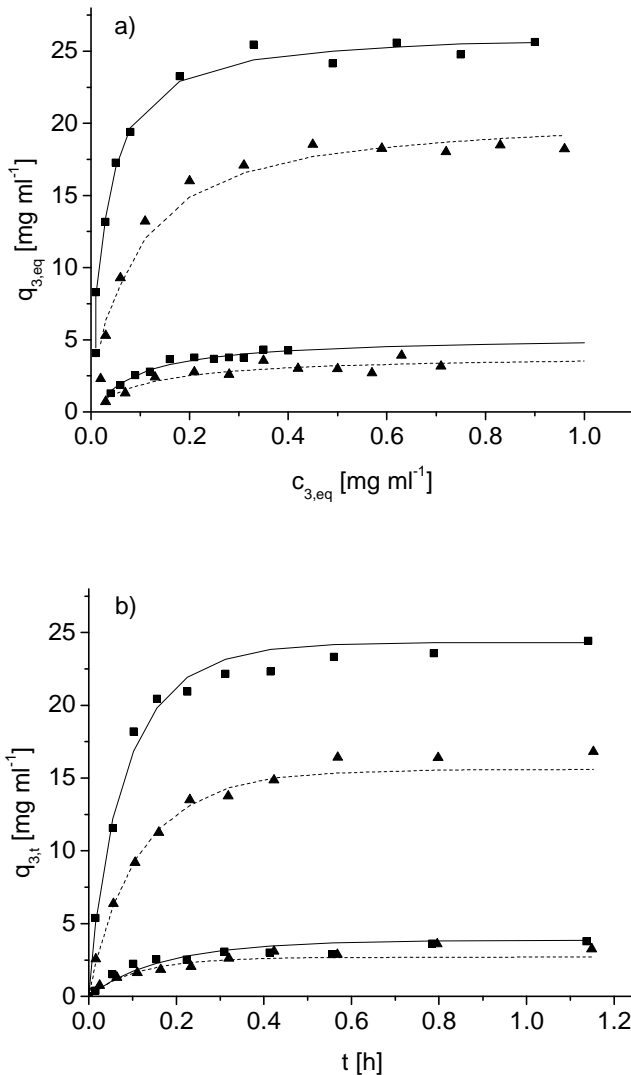


Bild 4.11: Isothermen- und Kinetikdaten des Systems BSA / Phenyl-Sepharose FF low sub mit variablen Konzentrationen an NaCl, bzw. (NH₄)₂SO₄.

Puffersysteme: 0,1 M KPO₄ + 0,35 M, 2,0 M (■) (NH₄)₂SO₄ / NaPO₄ + 1,25 M, 5,0 M (▲) NaCl,

4 Ergebnisse

vgl. **Tabelle 3.4**.

a) Isothermendaten im Adsorptionsgleichgewicht: Aufgetragen ist die Proteinkonzentration auf dem Adsorbens $q_{3,eq}$ in mg Protein pro ml Adsorbens über der Proteinkonzentration in der Flüssigphase nach Einstellung des Adsorptionsgleichgewichts.

b) Kinetikdaten: Aufgetragen ist die Beladung der Adsorbentien $q_{3,t}$ in mg Protein pro ml Gel über der Zeit t in Stunden. Ausgangskonzentration: $1,2 \text{ mg ml}^{-1}$. Für jeden Datensatz wurden Langmuir Parameter (3) angepasst (—), (---). Die Parameter-Werte sind in **Tabelle 4.7** dargestellt.

Unter alleiniger Berücksichtigung der Flüssigphasendaten können die drei fundamentalen Parameter dieses Modells, die Maximalkapazität q_{\max} und die Affinitätskonstante K_a aus den Isothermendaten sowie die Adsorptionsrate k_a aus den Kinetikdaten ermittelt werden. Sie sind in **Tabelle 4.7** dargestellt.

Tabelle 4.7: Ergebnisse der Parameteranpassung an Flüssigphasendaten der Adsorptionskinetiken des Protein-Adsorbens-Paars BSA-Phenyl-Sepharose low sub in beiden verwendeten Phosphat-Puffersystemen mit den jeweiligen Extremwerten für die Salzkonzentrationen von NaCl, bzw. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

¹⁾ Verwendete Puffersysteme: Phosphatpuffersysteme, pH 7 mit 350 mM (AS035), 2 M (AS200) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, bzw. 2,5 M (NC250), 5 M (NC500) NaCl, vgl. **Tabelle 3.4**; ^{2,3)} Maximale Adsorbenskapazität q_{\max} , Affinitätskonstante K_a nach *Langmuir*, eingeführt in (3), aus der Isothermenmessung; ^{4,6)} Regressionsgüte der Datenanpassung an die Isothermenmessung, bzw. die Kinetikmessung; ⁵⁾ Adsorptionsrate k_a nach *Langmuir*, eingeführt in (1) aus den Kinetikmessungen.

Puffer-system ¹⁾	q_{\max} ²⁾ [mM]	K_a ³⁾ [mM ⁻¹]	R^2 ⁴⁾ [1]	k_a ⁵⁾ [mM ⁻¹ s ⁻¹]	R^2 ⁶⁾ [1]
AS035	0,08	597,26	0,95	0,13	0,94
AS200	0,40	1851,62	0,98	0,42	1,08
NC125	0,06	568,85	1,01	0,13	1,02
NC500	0,31	1171,59	0,89	0,26	0,93

Bei beiden verwendeten Salzarten nehmen die beiden Isothermenparameter, die Maximalkapazität q_{\max} und Affinität K_a , mit zunehmender Salzkonzentration innerhalb einer Salzart ebenfalls zu. Das kosmotropere Salz $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ beeinflusst die Adsorption wesentlich stärker als das chaotropere Salz NaCl. Die zwei- bis dreifache Menge an NaCl ist notwendig, um in etwa dieselben Werte bei der Beladung der Adsorbentien zu erreichen wie bei $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Die Affinitätskonstante, ein Maß für die Steigung der Isotherme im linearen Anfangsbereich, nimmt ebenfalls mit zunehmender Salzkonzentration zu und ist

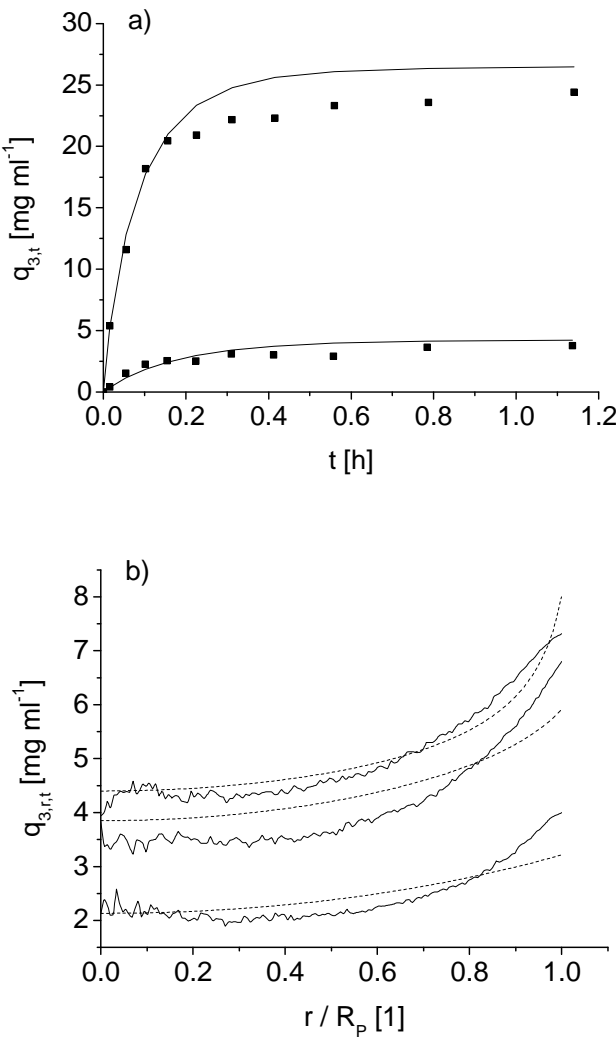
4.4 Einfluss chromatographischer Prozessparameter auf HIC Systeme

besonders bei den Maximalkonzentrationen beider Salzarten bei $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ deutlich höher als bei NaCl. Da sich die Desorptionsraten für alle gemessenen Systeme in denselben Größenordnungen bewegen (ca. 10^{-4} s^{-1} , Daten nicht gezeigt) nehmen folglich nach (1) auch die Adsorptionsraten mit steigender Salzkonzentration zu und sind bei hohen Salzkonzentrationen bei $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ höher als bei NaCl. Diese Tendenzen sind für jedes untersuchte Protein sowie Adsorbens zu beobachten.

Flüssig- und Festphasenanalyse

Bei der Anpassung der experimentell ermittelten Adsorptionskinetiken an das erweiterte Porendiffusionsmodell wurden lediglich die Affinitätskonstanten K_a aus den Isothermendaten verwendet. Die Maximalkapazität q_{\max} wird aus dem Konzentrationsprofil selbst ermittelt, das in Kapitel 5.1.5 ausführlicher diskutiert wird. In **Bild 4.12** sind die Flüssigphasendaten der Adsorptionskinetik für beide bereits gezeigten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Systeme zusammen mit den zugehörigen intrapartikulären Konzentrationsprofilen zu drei Zeitpunkten, 0,06, 0,32 und 1,15 h dargestellt.

4 Ergebnisse



4.4 Einfluss chromatographischer Prozessparameter auf HIC Systeme

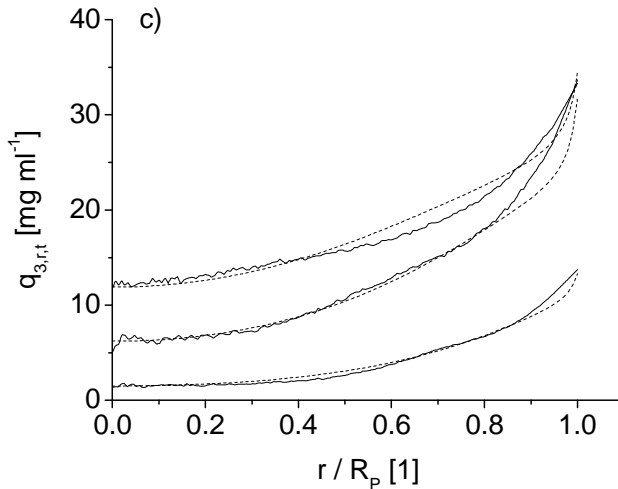


Bild 4.12: Flüssigphasendaten zu zehn und intrapartikuläre Konzentrationsprofile zu drei Zeitpunkten einer Adsorptions-kinetik von BSA auf Phenyl-Sepharose FF low sub in 0,1 M NaPO₄ mit variablen Konzentrationen an (NH₄)₂SO₄.

(a) Adsorptionskinetiken in 0,35 M, bzw. 2 M (NH₄)₂SO₄. Ausgangskonzentration an BSA: 0,87 mg ml⁻¹ (0,35 M (NH₄)₂SO₄), bzw. 1,13 mg ml⁻¹ (2 M (NH₄)₂SO₄). Aufgetragen ist die Proteinkonzentration im Überstand über der Inkubationsdauer in h.

(b, c) Zugehörige intrapartikuläre Konzentrationsprofile zu den Zeitpunkten t=0,06 h, 0,32 h und 1,15 h der in Abbildung (a) dargestellten Kinetiken in 0,35 M (b) sowie 2 M (NH₄)₂SO₄ (c).

Aufgetragen ist die intrapartikuläre Proteinbeladung, die spezifisch für die jeweilige Adsorbensschale ($r_i - r_{i-1}$) gemessen bzw. simuliert wurde. Die Beladung wird in mg Protein per ml Adsorbensschale als Funktion des normierten Radius r/R_p aufgetragen. Die zugehörigen simulierten Konzentrationsprofile (---), die sich aus der Parameteranpassung für das erweiterte Porendiffusionsmodell (s. Kap. 4.3.2) ergaben, sind dabei gegen die gemessenen, korrigierten Profile (—) aufgetragen.

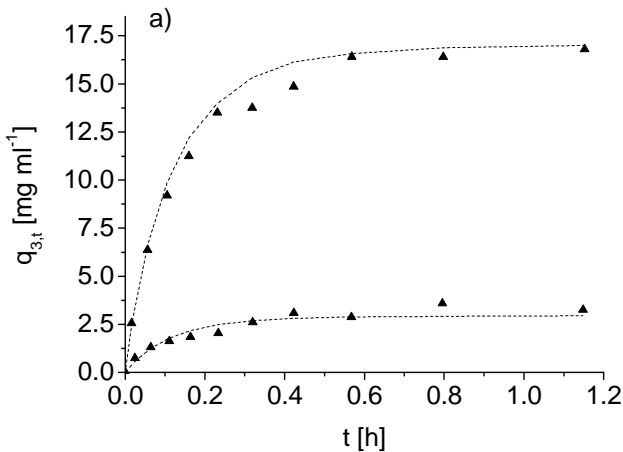
Bei der Flüssigphasenanalyse ist die simulierte Konzentrationsabnahme bei Anwendung des erweiterten Porendiffusionsmodells höher als bei direkter Anwendung der Langmuir-Gleichung. Der intrapartikuläre Konzentrationsverlauf wird bei der Salzkonzentration von 2 M, also bei insgesamt höheren absoluten Beladungswerten besser durch das Modell beschrieben als bei der Salzkonzentration von 0,35 M. Die Profilverläufe sind in beiden Fällen konkav.

4 Ergebnisse

Bei 0,35 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ist die Beladung in den äußeren Adsorbenschalen zu allen Zeitpunkten etwa doppelt so hoch wie in der Partikelmitte, bei 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mehr als dreimal so hoch.

Für die analogen NaCl Systeme in **Bild 4.13** gilt bezüglich der Ergebnistrends das zuvor Gesagte mit dem Unterschied, dass der konkave Verlauf der Profile schwächer ausgeprägt ist.

Bei der niedrigsten Salzkonzentration von 1,25 M NaCl ist die Beladung der Partikel nahezu homogen. Bei der höchsten Salzkonzentration von 5 M NaCl ist die Beladung in den äußersten Adsorbenschalen etwa doppelt so hoch wie in der Partikelmitte.



4.4 Einfluss chromatographischer Prozessparameter auf HIC Systeme

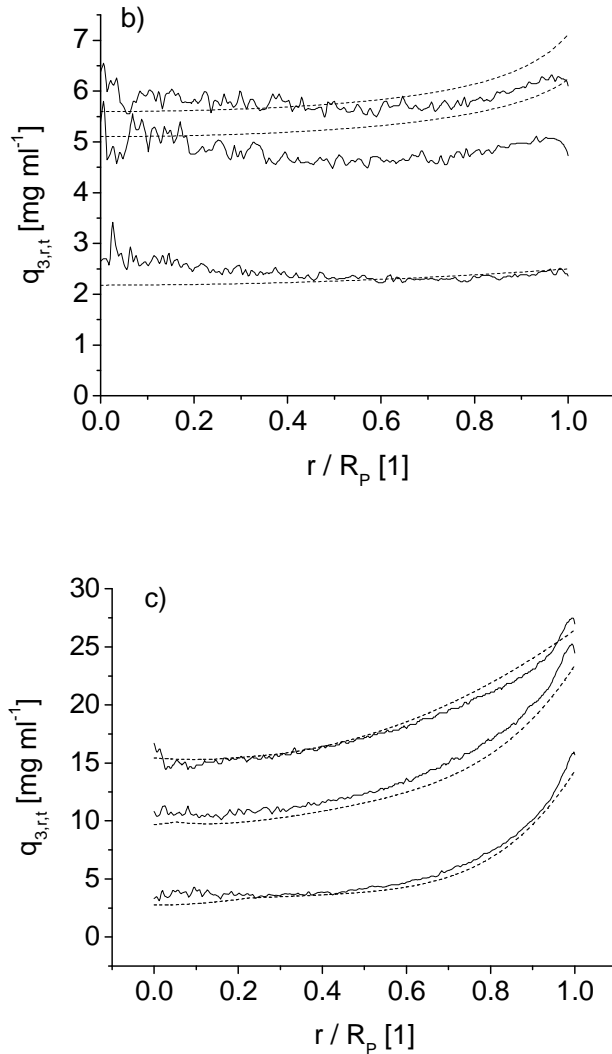


Bild 4.13: Flüssigphasendaten und Intrapartikuläre Konzentrationsprofile zu drei Zeitpunkten einer Adsorptionskinetik von BSA auf Phenyl-Sepharose FF low sub in 0,02 M NaPO₄ mit variablen Konzentrationen an NaCl.

4 Ergebnisse

(a) Adsorptionskinetiken in 1,25 M, bzw. 5 M NaCl. Ausgangskonzentration an BSA: 0,93 mg ml⁻¹ (1,25 M NaCl), bzw. 1,08 mg ml⁻¹ (5 M NaCl). Aufgetragen ist die Proteinkonzentration im Überstand über der Inkabtionsdauer in h.

(b, c) Zugehörige intrapartikuläre Konzentrationsprofile zu den Zeitpunkten t=0,06 h, 0,32 h und 1,15 h der in Abbildung (a) dargestellten Kinetiken in 1,25 M (b) sowie 5 M NaCl (c).

Aufgetragen ist die intrapartikuläre Proteinbeladung, die spezifisch für die jeweilige Adsorbensschale ($r_i - r_{i-1}$) gemessen bzw. simuliert wurde. Die Beladung wird in mg Protein per ml Adsorbensschale als Funktion des normierten Radius r/R_P aufgetragen. Die zugehörigen simulierten Konzentrationsprofile (---), die sich aus der Parameteranpassung für das erweiterte Porendiffusionsmodell (s. Kap. 4.3.2) ergaben, sind dabei gegen die gemessenen, korrigierten Profile (—) aufgetragen.

Die für die Parameter des erweiterten Porendiffusionsmodells erhaltenen Werte sind für alle vier zuvor gezeigten Systeme in **Tabelle 4.8** dargestellt.

Tabelle 4.8: Ergebnisse aus der Parameteranpassung von Flüssig- und Festphasendaten der Adsorptionskinetiken des Protein-Adsorbens-Paars BSA-Phenyl-Sepharose low sub mit variablen Konzentrationen von NaCl, bzw. (NH₄)₂SO₄.

¹⁾ Verwendete Puffersysteme: Phosphat-Puffer, pH7 mit 350 mM (AS035) oder 2 M (AS200) (NH₄)₂SO₄, bzw. mit 1,25 M (NC125) oder 5 M (NC500) NaCl (vgl. **Tabelle 3.4**); ²⁾ Maximalkapazität q_m und Adsorptionsrate k_a nach Langmuir, eingeführt in (1); ³⁾ Hinderungsparameter des nativen, adsorbierten Proteins γ_{nativ} , sowie des adsorbierten, entfalteten Proteins $\gamma_{\text{entfaltet}}$ aus (21), bzw. für n aus (19). (19) dient zur Berechnung des Mengenanteils an nativem Protein auf den Adsorbentien; ⁴⁾ Regressionsgüte; ⁵⁾ Relative Beladung der äußeren Adsorbensschalen von 0,75 – 1 r/R_P bezogen auf die Gesamtbeladung des Referenz-Adsorbenspartikels im Adsorptionsgleichgewicht $q_{\text{eq,rel}}$.

Puffer-system ¹⁾	q_{max} ²⁾ [mM]	k_a ²⁾ [mM ⁻¹ s ⁻¹]	γ_{nativ} ³⁾ [mM ⁻¹]	$\gamma_{\text{entfaltet}}$ ³⁾ [mM ⁻¹]	n ³⁾ [1]	R ² ⁴⁾ [1]	$q_{\text{eq,rel}}$ ⁵⁾ [%]
AS035	0,11	0,16	1784	3,6	1,7	0,92	60
AS200	0,52	0,50	5411	9,7	1,7	0,89	67
NC125	0,10	0,16	1051	2,0	6,2	0,92	59
NC500	0,42	0,31	3606	7,9	3,1	0,95	64

Die in **Tabelle 4.8** dargestellten Werte stellen einen Auszug aus den in **Tabelle 6.1** dargestellten Werten dar. Die Trends sind für die beiden Phenyl-Sepharose Adsorbentien und für alle drei verwendeten Proteine gleich.

Der Profilverlauf ist bei direktem Vergleich eines Protein-Adsorbenspaares in den beiden Salzarten bei Ammoniumsulfat stärker konkav ausgeprägt als bei

4.4 Einfluss chromatographischer Prozessparameter auf HIC Systeme

Natriumchlorid, was sich in den höheren relativen Beladungswerten $q_{eq,rel}$ widerspiegelt, die das Verhältnis der Proteinbeladung in den äußeren Adsorbensschalen von 0.75 bis 1 r/R_p im Verhältnis zu der Gesamtbeladung ausdrückt.

Für beide Puffersysteme gilt wiederum generell, dass die unter Verwendung des Erweiterten Porendiffusionsmodells erhaltenen Maximalkapazitäten q_{max} um 5% - 25% höher sind als die unter direkter Anwendung der Langmuir-Gleichung erhaltenen. Dies ist darin begründet, dass die Beladung der äußeren Schalen bedingt durch den konkaven Profilverlauf höher ist als im Partikeldurchschnitt, was eine höhere Maximalkapazität bezogen auf eine Volumeneinheit dieser Adsorbenschale zur Folge hat. Beim Vergleich der beiden Salzarten ist der Unterschied bei den Ammoniumsulfat-Puffern größer ist als bei den Natriumchlorid-Puffern, was durch die oben beschriebenen unterschiedlichen Profilverläufe bedingt ist.

Die Adsorptionsrate k_a beschreibt beim Erweiterten Porendiffusionsmodell lediglich den direkten Adsorptionsvorgang des Proteins ausgehend von der Porenflüssigkeit an die Adsorbenswand und ist somit mit dem Summenparameter bei direkter Anwendung der Langmuirgleichung nicht vergleichbar. Dennoch geben diese Parameter aus der einfacheren Modellanpassung die in der aufwendigeren Datenanalyse beobachteten Trends korrekt wieder.

Für ein Protein-Adsorbenspaar sind die Maximalkapazitäten q_{max} , Adsorptionsraten k_a und Hinderungsparameter γ_{nativ} bei den Ammoniumsulfat-Puffern höher als bei den Natriumchlorid-Puffern. Alle Parameter nehmen innerhalb einer Salzart mit zunehmender Konzentration ebenfalls zu.

Die Hinderungsparameter für die entfaltete Konformation und/oder weniger sperrige Anordnung der adsorbierten Proteine γ_{entf} bewegen sich allesamt in einer Größenordnung von 1-10 bei Randbedingungen von $0 < \gamma_{entf} < 25$. Sie sind von der Salzart unabhängig und nehmen mit zunehmender Salzkonzentration ebenfalls zu.

Die Hinderungsparameter für die native Konformation und/oder sperrigere Anordnung der adsorbierten Proteine liegen in einem Größenbereich von 1500 – 10000 bei Randbedingungen von $0 < \gamma_{nativ} < 50000$ und sind somit um den Faktor 1000 höher als die zuvor genannten γ_{entf} . γ_{nativ} nimmt mit zunehmender Salzkonzentration ebenfalls zu. Bei den für die jeweilige Salzart verwendeten

4 Ergebnisse

Maximalkonzentrationen lassen sich für Ammoniumsulfat höhere Werte erzielen als für Natriumchlorid.

Bezogen auf ein Protein-Adsorbens-Paar liegen die Werte für den Strukturparameter n bei den Ammoniumsulfatpuffern deutlich niedriger als bei Natriumchlorid. Gemäß (19) definiert n als Potenzwert den Anteil x_{nativ} an Proteinen, die eine sterisch stärker hindernde Form im adsorbierten Zustand in Abhängigkeit von ihrer fraktionellen Beladung (q / q_{max}) einnehmen. Die Werte für n sind stark von der verwendeten Salzart abhängig. Sie liegen für Natriumchlorid etwa eine Zehnerpotenz höher als für Ammoniumsulfat. Nach dieser in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Modellvorstellung bedingt Ammoniumsulfat einen höheren Anteil an x_{nativ} als Natriumchlorid. Mit steigender Ammoniumsulfatkonzentration bleiben die Werte für n auch weitestgehend konstant, während die insgesamt wesentlich höheren Werte für Natriumchlorid mit steigender Salzkonzentration, d.h. auch mit steigender Beladung des Adsorbens, abnehmen. Somit wird mit zunehmender Beladung der Anteil an x_{nativ} bei Verwendung von Natriumchlorid größer, wohingegen der ohnehin hohe Anteil von x_{nativ} bei Verwendung von Ammoniumsulfat konstant bleibt. Die höheren Kapazitäten und konkavere Profile, die sich durch Verwendung von Ammoniumsulfat erhalten lassen, bedeuten gleichzeitig eine räumlich dichter gepackte Beladung der Adsorbensmatrix und damit eine sterisch stärker hindernde, d.h. stärker Transport behindernde Anordnung der Adsorpte.

4.4.2 Ligandendichte: Phenyl-Liganden auf Sepharose 6 FF Partikeln

Im folgenden Unterkapitel sind für das Protein Mab01 drei verschiedene Puffersysteme dargestellt, für jedes Protein-Puffer-Paar wird der Einfluss der Ligandendichte untersucht. Phenyl-Sepharose high sub hat mit 40 pmol ml^{-1} eine doppelt so hohe Ligandendichte wie Phenyl-Sepharose low sub.

4.4 Einfluss chromatographischer Prozessparameter auf HIC Systeme

Flüssigphasenanalyse

Unter alleiniger Berücksichtigung der Flüssigphasendaten (Daten nicht gezeigt) können in Analogie zu der in Kapitel 4.4.1 dargestellten Vorgehensweise die in **Tabelle 4.9** dargestellten *Langmuir*-Parameter erhalten werden.

Tabelle 4.9: Ergebnisse der Parameteranpassung an Flüssigphasendaten der Adsorptionskinetiken von drei verschiedenen Protein-Puffer-Paaren jeweils mit Mab01 und Phenyl-Sepharose in beiden Ligandendichten.

¹⁾ Verwendete Puffersysteme: Phosphatpuffersysteme, pH 7 mit 70 mM (AS070), bzw. 2,5 M (NC250), 5 M (NC500) NaCl, vgl. **Tabelle 3.4**; ^{2,3)} Maximale Adsorbenskapazität q_{\max} , Affinitätskonstante K_a nach *Langmuir*, dargestellt in (3) aus der Isothermenmessung; ^{4,6)} Regressionsgüte der Datenanpassung an die Isothermenmessung, bzw. die Kinetikmessung; ⁵⁾ Adsorptionsrate k_a nach *Langmuir*, dargestellt in (1) aus den Kinetikmessungen.

System ¹⁾	q_{\max} ²⁾ [mM]	K_a ³⁾ [mM ⁻¹]	R^2 ⁴⁾ [1]	k_a ⁵⁾ [mM ⁻¹ s ⁻¹]	R^2 ⁶⁾ [1]
PLAS070	0,17	2442,42	0,99	0,54	0,94
PHAS070	0,24	4237,01	0,99	0,94	0,96
PLNC250	0,07	1608,23	0,96	0,36	0,94
PHNC250	0,16	2581,53	0,90	0,57	0,99
PLNC500	0,21	3058,55	0,90	0,68	1,01
PHNC500	0,31	4873,52	0,95	1,09	0,95

Eine Verdopplung der Menge an immobilisierten Liganden führt für alle untersuchten Protein-Puffersysteme zu einem deutlichen Anstieg aller drei Parameter um bis zu 50%. Die doppelte Ligandendichte beeinflusst die Desorptionsrate (ca. 10^{-4} s^{-1} , Daten nicht gezeigt) nicht, was nach (1) an dem quasi-proportionalen Anstieg der Adsorptionsraten k_a mit den jeweiligen Affinitäten K_a ersichtlich ist.

Flüssig- und Festphasenanalyse

Die Parameteranpassung erfolgte in Analogie zu der in Kapitel 4.4.1 beschriebenen Vorgehensweise. Die Flüssig- und Festphasendaten (Daten nicht

4 Ergebnisse

gezeigt) der bereits in dem vorigen Unterkapitel dargestellten Systeme resultierten in den in **Tabelle 4.10** dargestellten Parametern.

Tabelle 4.10: Ergebnisse aus der Parameteranpassung von Flüssig- und Festphasendaten von den Adsorptionskinetiken der Protein-Adsorbens-Paare Mab01-Phenyl-Sepharose low sub, bzw. Mab01-Phenyl Sepharose high sub mit variablen Konzentrationen von NaCl.

¹⁾ Verwendete Puffersysteme: Phosphatpuffersysteme, pH 7 mit 70 mM (AS070), bzw. 2,5 M (NC250), 5 M (NC500) NaCl (vgl. **Tabelle 3.4**); ²⁾ Maximalkapazität q_m und Adsorptionsrate k_a nach *Langmuir*, s. (1); ³⁾ Hinderungsparameter des nativen, adsorbierten Proteins γ_{nativ} , sowie des adsorbierten, entfalteten Proteins $\gamma_{\text{entfaltet}}$ sowie Exponent n aus (19) zur Berechnung des Mengenanteils an nativem Protein auf den Adsorbentien; ⁴⁾ Regressionsgüte; ⁵⁾ Relative Beladung der äußeren Adsorbenschalen von $0,75 - 1 \text{ r/R}_p$ bezogen auf die Gesamtbeladung des Referenz-Adsorbenspartikels im Adsorptionsgleichgewicht $q_{\text{eq,rel}}$.

Puffer-system ¹⁾	q_{max} ⁴⁾ [mM]	k_a ⁴⁾ [mM ⁻¹ s ⁻¹]	γ_{nativ} ⁴⁾ [mM ⁻¹]	$\gamma_{\text{entfaltet}}$ ⁴⁾ [mM ⁻¹]	n ⁴⁾ [1]	R^2 ⁵⁾ [1]	$q_{\text{eq,rel}}$ [%]
PLAS070	0,31	0,66	4638	5,4	13,9	0,95	62
PHAS070	0,29	1,14	5761	9,0	2,6	0,88	66
PLNC250	0,12	0,43	3507	3,7	12,1	0,98	61
PHNC250	0,22	0,69	4353	5,4	6,9	0,87	63
PLNC500	0,29	0,82	9320	9,2	9,9	0,92	65
PHNC500	0,42	1,34	9957	9,4	3,1	0,93	72

Die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Modellparameter q_{max} und k_a in beiden Modellansätzen sind in Kapitel 4.4.1 beschrieben.

Die Profile haben eine stärkere konkave Ausprägung bei der höheren Ligandendichte, was sich durch eine höhere relative Kapazität $q_{\text{eq,rel}}$ in den äußeren Adsorbenschalen von $0,75$ bis 1 r/R_p bemerkbar macht.

Die Hinderungsparameter für das native Protein, bzw. das Protein in der sperrigeren Konfiguration γ_{nativ} sind größer für die höhere Ligandendichte. Der Effekt ist für beide Salzarten bei niedrigeren Salzkonzentrationen mit ca. 25% - 35% größer als bei höheren Salzkonzentrationen, bei denen die Werte 5% - 15% höher liegen. Die Absolutwerte von γ_{nativ} liegen zwischen 1500 und 10000.

Die Werte für die Hinderungsparameter des entfalteten Zustands, $\gamma_{\text{entfaltet}}$, verhalten sich analog zu den Werten von γ_{nativ} , wobei die Absolutwerte in einem Wertebereich zwischen 1 und 10 liegen.

4.4 Einfluss chromatographischer Prozessparameter auf HIC Systeme

Der Strukturparameter n , definiert in (19), wird durch die Ligandendichte ebenfalls deutlich beeinflusst. Er ist bei der höheren Ligandendichte deutlich niedriger. Analog zu den im vorigen Unterkapitel beschriebenen Ergebnissen werden durch Verwendung einer höheren Ligandendichte höhere Kapazitäten sowie konkavere Profile erhalten, was in einer höheren Beladungsdichte resultiert. Diese höhere Beladungsdichte geht einher mit einer sterisch stärker hindernden, d.h. stärker Transport behinderenden Anordnung der Adsorpte.

4.4.3 Proteinhydrophobizität & -größe: Charakterisierung anhand verschiedener Kennzahlen

Im folgenden Kapitel sind für das Adsorbens-Puffer-Paar Phenyl Sepharose low sub und den 0,02 M Natriumphosphat-Puffer mit 3,75 M Natriumchlorid, sowie für das analoge Paar mit Phenyl-Sepharose high sub die Ergebnisse für alle drei verwendeten Proteine BSA, Mab01 und Mab02 dargestellt. Gemäß der Definition von *Bigelow et. al.* beträgt deren mittlere Hydrophobizität für BSA 1174 kcal / residue, für Mab01 1577 kcal / residue und für Mab02 1434 kcal / residue [Bigelow 1967]. Die Größe ‚residue‘ bezeichnet dabei eine Aminosäure. Ausgehend von dieser aus der Primärsequenz abgeleiteten Größe, die in Kapitel 2.3.2 dargestellt ist, ergibt sich somit eine Rangfolge abnehmender Hydrophobizität von: Mab01 > Mab02 > BSA.

Flüssigphasenanalyse

Unter alleiniger Berücksichtigung der Flüssigphasendaten (Daten nicht gezeigt) können in Analogie zu der in Kapitel 4.4.1 dargestellten Vorgehensweise die in **Tabelle 4.11** dargestellten *Langmuir*-Parameter erhalten werden.

4 Ergebnisse

Tabelle 4.11: Ergebnisse der Parameteranpassung an Flüssigphasendaten der Adsorptionskinetiken von zwei verschiedenen Adsorbens-Puffer-Paaren, Phenyl-Sepharose low sub / high sub-0,02 M, NaPO_4^- , 3,75 M NaCl jeweils mit BSA, Mab01 und Mab02.

¹⁾ Verwendete Puffersysteme: Phosphatpuffersysteme, pH 7 mit 3,75 M (NC375) NaCl, vgl. **Tabelle 3.4**; ^{2, 3)} Maximale Adsorbenskapazität q_{\max} , Affinitätskonstante K_a nach Langmuir, dargestellt in (3), aus der Isothermenmessung; ^{4, 6)} Regressionsgüte der Datenanpassung an die Isothermenmessung, bzw. Kinetikmessung; ⁵⁾ Adsorptionsrate k_a nach Langmuir, dargestellt in (1), aus den Kinetikmessungen.

System ¹⁾	q_{\max} ²⁾ [mM]	K_a ³⁾ [mM ⁻¹]	R^2 ⁴⁾ [1]	k_a ⁵⁾ [mM ⁻¹ s ⁻¹]	R^2 ⁶⁾ [1]
PLBSA	0,24	958,31	0,85	0,21	0,99
PLM01	0,15	2798,67	0,94	0,62	1,02
PLM02	0,17	1428,45	1,02	0,32	1,02
PHBSA	0,54	1352,98	1,06	0,30	0,95
PHM01	0,25	3570,69	0,93	0,81	0,94
PHM02	0,29	2325,65	0,91	0,52	0,97

Wie in Kapitel 4.4.1 ausführlicher beschrieben liegen die Werte für die Maximalkapazität q_m und die Adsorptionsrate k_a höher im Vergleich zu den Parameterwerten, die aus der direkten Anwendung der Langmuir-Gleichung resultierten. Dies ist im Fall von q_m durch den konkaven Profilverlauf im Gegensatz zu dem homogenen Profilverlauf, der bei der direkten Anwendung des *Langmuir*-Modells auf die Flüssigphasendaten vorausgesetzt wird, zu erklären. Bezogen auf die Maximalkapazität q_m ergibt sich die Rangfolge: BSA > Mab02 > Mab01, was den genau gegenläufigen Trend zu mittleren Hydrophobizitäten der Proteine und allerdings auch zur Größe der Proteine darstellt. Somit hat das hydrophilste und kleinste Protein die höchste Maximalkapazität.

Genau umgekehrt verhält es sich bei der Affinität K_a mit der Rangfolge Mab01 > Mab02 > BSA. Die Adsorptionsraten k_a verhalten sich analog. Die Desorptionsraten sind folglich gemäß (1) weitestgehend konstant (ca. 10^{-4} s^{-1} , Daten nicht gezeigt).

Flüssig- und Festphasenanalyse

Die Parameteranpassung erfolgte in Analogie zu der in Kapitel 4.4.1 beschriebenen Vorgehensweise. Die Flüssig- und Festphasendaten (Daten nicht

4.4 Einfluss chromatographischer Prozessparameter auf HIC Systeme

gezeigt) der bereits in dem vorigen Unterkapitel dargestellten Systeme führten zu den in **Tabelle 4.12** dargestellten Parametern.

Tabelle 4.12: Ergebnisse aus der Parameteranpassung von Flüssig- und Festphasendaten von den Adsorptionskinetiken von zwei verschiedenen Adsorbens-Puffer-Paaren, Phenyl-Sepharose low sub / high sub-0,02 M, NaPO₄['], 3,75 M NaCl jeweils mit BSA, Mab01 und Mab02.

¹⁾ Verwendete Puffersysteme: Phosphatpuffersysteme, pH 7 mit 3,75 M (NC375) NaCl (vgl. **Tabelle 3.4**); ²⁾ Affinitätskonstante K_a nach Langmuir (3) aus der Isothermenmessung; ^{3, 5)} Regressionsgüte; ⁴⁾ Maximalkapazität q_{\max} , Adsorptionsrate k_a , Hinderungsparameter des nativen, adsorbierten Proteins γ_{nativ} , sowie des entfalteten Proteins $\gamma_{\text{entfaltet}}$, Exponent n aus (19) zur Berechnung des Mengenanteils an nativem Protein auf den Adsorbentien. ⁵⁾ Relative Beladung der äußeren Adsorbenschalen von 0,75 – 1 r/R_p bezogen auf die Gesamtbeladung des Referenz-Adsorbenspartikels im Adsorptionsgleichgewicht $q_{\text{eq,rel}}$.

System ¹⁾	q_{\max} ⁴⁾ [mM]	k_a ⁴⁾ [mM ⁻¹ s ⁻¹]	γ_{nativ} ⁴⁾ [mM ⁻¹]	$\gamma_{\text{entfaltet}}$ ⁴⁾ [mM ⁻¹]	n ⁴⁾ [1]	R^2 ⁵⁾ [1]	$q_{\text{eq,rel}}$ [%]
PLBSA	0,31	0,26	2974	5,9	3,9	0,87	62
PLM01	0,20	0,75	9076	8,4	11,4	0,89	63
PLM02	0,23	0,38	6497	5,6	6,4	0,92	59
PHBSA	0,71	0,36	4266	5,7	1,6	0,91	74
PHM01	0,33	0,95	9258	8,5	5,4	0,88	67
PHM02	0,38	0,62	7213	8,8	1,4	0,93	64

Die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Modellparameter q_{\max} und k_a in beiden Modellansätzen sind in Kapitel 4.4.1 beschrieben.

Die Hinderungsparameter für die native Konformation der adsorbierten Proteine, γ_{nativ} , liegen wie zuvor bereits beschrieben in einem Wertebereich zwischen 1500 und 10000 und klassifizieren die drei Proteine in Analogie zu den Adsorptionsraten: Mab01 > Mab02 > BSA.

Analog, wenn auch in wesentlich schwächerer Ausprägung, verhält es sich mit den Hinderungsparametern für die entfalten adsorbierten Proteine, $\gamma_{\text{entfaltet}}$. Hier sind speziell bei höheren Salzkonzentrationen oder der höheren Ligandendichte kaum Unterschiede zwischen beiden Antikörpern zu sehen.

Den größten Einfluss haben die Proteine auf den Exponenten n der in (19) definiert ist. Dieser Exponent bestimmt den Anteil an der postulierten, stärker Transport behindernden Anordnung oder Struktur der Adsorpte. Hier ergibt sich

4 Ergebnisse

die Rangfolge in Analogie zur mittleren Hydrophobizität: Mab01 > Mab02 > BSA. BSA verzeichnet den höchsten Anteil an Adsorpten in der stärker Transport behindernden Konfiguration, Mab01 den geringsten. Auffallend sind hier die wesentlich höheren Werte von Mab01 im Vergleich zu den anderen beiden Proteinen.

5 Diskussion und Ausblick

Von den beiden möglichen Betriebsweisen für das CLSM basierte Screening von chromatographischen Parametern in der HIC ging der Finite Bath Modus aus dem Vergleich mit dem Shallow Bed Modus als eindeutig robustere Methode hervor. Durch die Entwicklung eines vielschichtigen experimentellen Ansatzes konnten die beschreibbaren chromatographischen Systeme, d.h. Adsorptiv-Adsorbens-Laufmittel-Kombinationen, hinsichtlich typischer HIC-Prozessparameter, wie Proteingröße und Proteinhydrophobizität, Salzart und Salzkonzentration sowie Art und Dichte der funktionalen Liganden auf den Adsorbentien klassifiziert werden.

Dennoch konnten auch mit dem Finite Bath Modus nicht alle untersuchten chromatographischen Systeme charakterisiert werden. Wie in Kapitel 4.4 dargestellt, erfüllten lediglich 53 % der Systeme die Bedingungen für eine mögliche Beschreibbarkeit mit dem Erweiterten Porendiffusionsmodell, wie es in Kapitel 4.3.2 exemplarisch gezeigt ist. Diesen Untersuchungen war eine Vorauswahl vorausgegangen, bei der in Löslichkeitsexperimenten, zusammengefasst in **Tabelle 4.1**, bereits ein Vielfaches dieser Menge an anderen potentiell geeigneten Systemen durch die entwickelten Selektionsmethoden aussortiert werden konnte. Desweiteren wurden auch für formal gleiche Systeme, bei denen in einem Fall die Beschreibbarkeit gelang, in anderen Messungen Daten erhalten, welche die aufgestellten Kriterien nicht erfüllten, wie in Kapitel 4.2.3 dargestellt. Diese Heterogenität der Ergebnisse wird zusammen mit den zugrunde liegenden Adsorptionsphänomenen in Kapitel 5.2.1 diskutiert.

Die durch die Ergebnislage aufgezeigte Komplexität der in der HIC auftretenden Adsorptionsphänomene bedingt die Notwendigkeit eines hier entwickelten vielschichtigen Ansatzes, wenn die CLSM Analyse für die Entwicklung und Optimierung von HIC Prozessen eingesetzt werden soll. Sie zeigt allerdings auch, dass eine schnelle, praktische Implementierung dieser Analysemethode in den Alltag der industriellen Prozessentwicklung nicht gegeben ist. Vielmehr bleibt sie vorwiegend auf den akademischen Bereich beschränkt. Der potentielle Nutzen des Informationsgewinns, der durch diese Analyse in dieser Betriebsweise erzielt

5 Diskussion und Ausblick

wird, wird ebenfalls in Kapitel 5.2.1 diskutiert: Zum einen im Hinblick auf die reine Optimierung von Prozessparametern, zum anderen bzgl. potentieller Anwendungen als zusätzliche produktbezogene Prozesscharakterisierung.

Durch die Anwendung des Erweiterten Porendiffusionsmodells konnte die starke Beeinflussung der Adsorpte durch die HIC Adsorptionsbedingungen gezeigt werden. Möglichkeiten und vielmehr Beschränkungen eines direkten experimentellen Nachweises werden in Kapitel 5.2.2 diskutiert.

Neben der Komplexität der HIC Adsorption ist die CLSM Analyse im Finite Bath Betriebsmodus Limitierungen unterworfen, die im folgenden Kapitel 5.1 diskutiert werden.

Ein Ausblick auf mögliche weiterführende Experimente wird in Kapitel 5.3 gegeben. Dies geschieht auch im Zusammenhang mit bereits verfolgten, im Ergebnisteil nicht gezeigten, Experimenten, die dort kurz skizziert werden.

5.1 Limitierungen der CLSM Analyse im Finite Bath Modus

Bedingt durch die Messweise der CLSM, bei der in Form von ‚optischen Schnitten‘ im Inneren von lichtdurchlässigen Partikeln gemessen wird und bedingt durch die Notwendigkeit, bei einem 1-Photonenmikroskop eine Minderheit der Proteinadsorptiva mit Fluorophoren zu markieren, ergeben sich potentielle systematische Messfehler:

- Die Quantenausbeute der Fluorophore kann sich in Abhängigkeit von ihren Umgebungsbedingungen in unmittelbarer Nähe, wie Polarität oder pH-Wert des Lösungsmittels, verändern. Dies ist in Kapitel 2.4.2 dargestellt. Sind diese Umgebungsbedingungen im Partikelinneren örtlich variabel und abhängig von dem Beladungsgrad der Adsorbentien, so ergeben sich Veränderungen in der Stärke des Emissionssignals.
- Es können Lichtabschwächungseffekte („Quenching“, vgl. Kapitel 2.4.2) im Inneren des Partikels auftreten, die bedingt sind durch Reabsorptionseffekte von Fluorophoren außerhalb der Fokusebene sowie durch Lichtbrechungseffekte der Adsorbensmatrix.

5.1 Limitierungen der CLSM Analyse im Finite Bath Modus

Diese durch die Messung der Fluoreszenzintensität im Inneren eines Partikels mit einer konfokalen Anordnung bedingten Effekte werden in Kapitel 5.1.1 diskutiert.

- Durch die Notwendigkeit der Proteinmarkierung mit Fluorophoren kann es zu 2-Komponenten, oder kompetitivem, Adsorptionsverhalten von markierten und unmarkierten Proteinen kommen, was gegebenenfalls in dem Modell berücksichtigt werden muss und bei Nicht-Berücksichtigung zu einer fehlerhaften Abbildung des intrapartikulären Konzentrationsverlaufs führt.

Kompetitives Adsorptionsverhalten von markierten und unmarkierten Proteinen in dieser Arbeit und in anderen Publikationen werden in Kapitel 5.1.2 diskutiert.

Durch die Verwendung des Finite Bath Modus ergeben sich potentielle systematische Messfehler:

- Die Adsorbentien müssen in dem Reaktionsgefäß in definierter Menge vorgelegt werden (vgl. Kapitel 3.2.4). Die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Adsorbensaliquotierung ist aufgrund dessen hoher Bindungskapazität die größte Fehlerquelle für die Bestimmung der Festphasenkonzentration an Gesamtprotein sowie an markierten Proteinen.

Die Bestimmung des relativen Fehlers bei der Adsorbensaliquotierung wird in Kapitel 5.1.4 beschrieben.

- Bei der CLSM Analyse der Adsorbentien mit der CLSM werden einige der Partikel nach Abstoppen der Inkubation und Abnahme des Überstandes manuell mit einer Pipette in ein Analysegefäß transferriert. Danach wird manuell auf die Äquatorialebene eines passend großen Partikels fokussiert (vgl. Kapitel 3.2.4). Aufgrund der heterogenen Größenverteilung der Adsorbentien mit Durchmessern von 65 – 135 μm ist es nicht möglich, immer exakt gleich große Partikel zu analysieren. Die engste experimentell realisierbare Größenverteilung war bei den hier vorgestellten Analysen ein variabler Partikeldurchmesser von 88 – 96 μm . Bei der Anpassung der experimentellen Daten an das Einzelpartikelmodell werden die variablen Partikeldurchmesser auf den in (12) definierten Referenzradius von 90 μm normiert. Dieser

5 Diskussion und Ausblick

Referenzradius entspricht dem mittleren Radius der Sepharose 6 FF Partikel, wie in **Tabelle 3.3** dargestellt.

Der Einfluss dieser Variation in den Partikeldurchmessern innerhalb der oben genannten Grenzen wird in Kapitel 5.1.5 diskutiert.

5.1.1 Optische Messartefakte bei der Messung der Fluoreszenzintensität mit der CLSM

Wie in der Einleitung in Kapitel 5.1 erwähnt, können ‚optische Messartefakte‘ der CLSM durch zwei Faktoren bedingt sein:

Konstante Quantenausbeute der Fluorophore

Eine konstante Quantenausbeute der Fluorophore in Abhängigkeit von ihrer Umgebung, d.h. bezogen auf die Festphasenkonzentration der markierten Proteine im adsorbierten Zustand, ist experimentell nicht nachweisbar und muss daher als fundamentale Voraussetzung für die Anwendbarkeit der CLSM Methode in dieser Arbeit vorausgesetzt werden. Eine variable Quantenausbeute kann nicht durch das verwendete Modell zur Korrektur der Lichtabschwächung erfasst werden, wie es in Kapitel 2.4.3 dargestellt ist. Dies liegt im Wesentlichen in der inhomogenen Beladungsverteilung im Inneren der Adsorbenspartikel begründet, wodurch bei der Ermittlung der Extinktionskoeffizienten für die Signalkorrektur eine konstante Quantenausbeute für die Datenanpassung notwendig ist (s.u.).

Die schon zuvor genannten Faktoren mit dem nach *Lakowicz et. al.* [Lakowicz 2006] potentiell stärksten Effekt auf die Quantenausbeute werden im Folgenden diskutiert:

Polarität des Lösungsmittels - Die Lösung der für die HIC benötigten Salze durch das Lösungsmittel Wasser beeinflusst lediglich die Polarität der an dem Solvatisierungsprozess beteiligten 2-3 Schichten von Wassermolekülen. Die Fluorophore sind an die ϵ -Aminogruppe der Lysinseitenketten gebunden, die sich wiederum hauptsächlich in geladenen, basischen Regionen auf der Proteinoberfläche befinden. Die Polarität der Wassermoleküle in der Hydrathülle um die hydrophilen, basischen Oberflächenabschnitte auf dem Protein sollte

5.1 Limitierungen der CLSM Analyse im Finite Bath Modus

demnach konstant, d.h. unbeeinflusst von den zugegebenen Salzen sein. Zudem sind die Fluorophore der hier hauptsächlich verwendeten Cy-Familie nach *Buschmann et. al.* weniger von der Polarität der Lösungsmittel als von der Viskosität der Lösung beeinflusst [Buschmann et al. 2003].

Viskosität - Die Viskositäten der verwendeten Puffersysteme unterscheiden sich. Allerdings werden für die Fluoreszenzmessungen in der Flüssigphase nur die relativen Werte verwendet, wie in Kapitel 3.2.4 dargestellt. Die messbaren Unterschiede in den Absolutwerten der Flüssigphase haben damit keinen Einfluss. Lokale Viskositätsunterschiede im Partikelinneren sind gerade im Bezug auf die unterschiedliche Hoch- und Niedrigdichteanordnung des Wassers sehr gut vorstellbar. Die Viskosität ist eine Impulsstromdichte und somit ein Maß für die ‚innere Zähigkeit‘ bedingt durch die Wechselwirkungen der Lösungsmittelmoleküle untereinander. Allerdings sollte auch hier wegen der geringen Reichweite der kosmotropen Agenzien im Bezug auf ihren strukturierenden Effekt genug Distanz vorhanden sein. Somit sollte das Fluorophor auf den geladenen Oberflächenregionen des Proteins stets von Hochdichtewasser umgeben sein. Das Niedrigdichtewasser sollte sich hauptsächlich auf, bzw. zwischen den hydrophoben Liganden und Oberflächenregionen des Proteins befinden. Bei hoher Proteinbeladung könnten sich diese räumlichen Trennungen allerdings abschwächen oder aufheben.

Auszuschließen ist eine veränderte lokale Viskosität und damit eine variierende Quantenausbeute bei hoher Beladung jedoch nicht.

pH-Wert – Der pH-Wert ist bei allen in dieser Arbeit verwendeten Systemen gepuffert. Lokale pH-Gradienten, wie z.B. durch *Donnan*-Effekte hervorgerufen [Levan et al. 1997], spielen bei den ungeladenen HIC-Liganden nach derzeitigem Erkenntnisstand keine Rolle, da dort nach diesen Theorien keine lokale Anreicherung von Salzionen erfolgen kann. Zudem sind die Fluorophore der Cy-Familie nach *Buschmann et. al.* innerhalb ihres Arbeitsbereiches relativ unempfindlich gegenüber pH-Werteinflüssen [Buschmann et al. 2003].

Förster Resonanz Energie Transfer – Der strahlungslose Energietransfer von einem Donor- zu einem Akzeptorfluorophor durch Kopplung ihrer Dipolmomente erfordert ein speziell abgestimmtes Paar von Fluorophoren [Lakowicz 2006]. Bei dem Großteil der in dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurde nur ein Fluorophor verwendet.

5 Diskussion und Ausblick

Lichtabschwächungseffekte bei der CLSM-Analyse

Die Lichtabschwächungseffekte beruhen nach vorherrschender Meinung hauptsächlich auf den unterschiedlichen Brechungsindizes der Adsorbentien und der Flüssigphase. Diese Hypothese kann dadurch verifiziert werden, dass man nach erfolgter Adsorption durch einen Austausch der Flüssigphase die Brechungsindizes angleicht und somit bei homogen beladenen Modellsystemen, z.B. zu dem zu erwartenden exponentiellen Abfall der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Weglänge kommt.

Malmsten et. al. verfolgte diesen Ansatz als erstes, indem er durch Zugabe von einer wässrigen Glucoselösung den Brechungsindex von Methacrylatpartikeln angleicht [Malmsten et al. 1999]. Weitere Autoren berichteten von der erfolgreichen Anwendung von anorganischen Lösungen [Bromley et al. 2002; Tallarek et al. 2003]. *Rosenbaum et. al.* untersuchte eine Serie von Ionenaustauschermaterialien, die eine Brechungsindexspanne von mehr als 0,1 abdeckten und deren Brechungsindizes mittels Saccharoselösungen oder einer Mischung aus Dimethylsulfoxid / Dimethylformamid angeglichen werden konnten [Rosenbaum et al. 2003]. In dieser Arbeit kamen *Rosenbaum et. al.* zu dem Schluss, dass die Unterschiede in den Brechungsindizes der Haupteinflussfaktor für die Lichtabschwächung bei der CLSM ist.

Diese Erkenntnis konnte durch die Modifikation des Korrekturmodells von *Heinemann et. al.* [Heinemann et al. 2004] durch *Susanto et. al.* und Anwendung auf die in dieser Arbeit verwendeten chromatographischen Systeme quantifiziert werden [Susanto et al. 2006]. Das Modell ist in Kapitel 2.4.3 dargestellt. Für den konzentrationsunabhängigen Extinktionskoeffizienten ϵ_{Matrix} , der nur die Lichtabschwächung durch die Adsorbentien berücksichtigt, wurde ein Wert von $6,14 \text{ cm}^{-1}$ ermittelt. Für den konzentrationsabhängigen Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{\text{Fluorophor}}$ ein Wert von $0,0322 \text{ cm}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ ml}$. Die Extinktionskoeffizienten unterscheiden sich somit um den Faktor 200. Aufgrund dieses sehr niedrigen Wertes von $\epsilon_{\text{Fluorophor}}$ beträgt die Lichtabschwächung erst 1% bei einer Scan-Tiefe von $45 \mu\text{m}$ und einer Konzentration von ca. 70 mg ml^{-1} an vollständig markierten Mab02. Dies entspricht einer Fluorophor-Konzentration von ca. 0,5M. Bei den verwendeten experimentellen Systemen ist der D/P Koeffizient stets kleiner als 0,1, wodurch sich ein Wert für die Lichtabschwächung von ca. 0,2% ergibt und

5.1 Limitierungen der CLSM Analyse im Finite Bath Modus

der Einfluss von $\varepsilon_{\text{Fluorophor}}$ vernachlässigt werden kann. Dies bestätigt auch die von *Linden et. al.* aufgestellte These, dass bei einer ausreichend geringen Fluorophorkonzentration der Reabsorptionseffekt vernachlässigt werden kann [Linden 2001].

Der zweitwichtigste Effekt nach der Lichtbrechung bedingt durch die unterschiedlichen Brechungsindizes ist nach *Heinemann et. al.* (s.o.) die *Raleigh*-Streuung, die in Kapitel 2.4.1 dargestellt ist. Da dieser Effekt grundsätzlich zu der Lichtabschwächung beiträgt, wird er durch das Korrekturmodell von *Susanto et. al.* (s.o.) für eine konstante Wellenlänge als Summenparameter für Hin- und Rückweg zusammen erfasst und korrigiert. Die konstante Wellenlänge stellt lediglich einen theoretischen Referenzwert für die Datenanpassung dar, der zwischen den Werten für die Anregungs- und Emissionswellenlängen liegt. Die Emissionswellenlänge ist um ca. 30nm größer als die Anregungswellenlänge und die durch *Raleigh*-Streuung verursachte Signalabschwächung im Emissionsstrahlengang um einen Betrag schwächer, der proportional zu $1/\lambda^4$ ist. Diese beiden unterschiedlichen Abschwächungen werden über die Weglänge integriert und zu einem Summenparameter zusammengefasst.

Im vorigen Unterkapitel wurde der Umstand erwähnt, dass eine konstante Quantenausbeute als Voraussetzung für die Anwendbarkeit des von *Susanto et. al.* (s.o.) modifizierten Modells gilt. Dies ist insofern erwähnenswert als das eine variable Quantenausbeute gerade ein Kernelement in dem Originalmodell von *Heinemann et. al.* (s.o.) ist. Dort wurde mit pH-Wert sensitiven Fluorophoren gearbeitet, deren Absorptionsmaximum und damit deren Quantenausbeute bezogen auf eine Referenz-Anregungswellenlänge in Abhängigkeit vom pH-Wert variiert. Neben der Lichtabschwächung durch die Adsorbentien, die praktisch eine Materialkonstante darstellen und in beiden Modellen berücksichtigt werden, sind die Abschwächungseffekte, welche von der Fluorophorkonzentration im Inneren des Partikels abhängen, unterschiedlich.

Das Modell von *Heinemann et. al.* berücksichtigt variierende Absorptions- und Emissionsspektren, und damit variierende Quantenausbeuten bezogen auf eine Referenz-Anregungswellenlänge und damit variierend starke (Re-)absorption und Emission.

Das Modell von *Susanto et. al.* berücksichtigt konstante Absorptions- und Emissionsspektren, d.h. auch konstante Quantenausbeuten bei konstanter

5 Diskussion und Ausblick

Anregungswellenlänge, allerdings unterschiedlich starke Reabsorptionseffekte bedingt durch unterschiedlich hohe Fluorophorkonzentrationen im Partikelinneren. Die unbekannte Fluorophorkonzentration muss bei der Ermittlung der Extinktionskoeffizienten durch Anpassung des Faktors a_0 der quadratischen Funktion, die in (57) dargestellt ist, ebenfalls ermittelt werden. Somit ist die Zahl der anpassbaren Modellparameter erschöpft und die Quantenausbeute muss als konstant angenommen werden.

5.1.2 Kompetitives Adsorptionsverhalten von markierten und unmarkierten Proteinen

Die Frage nach konkurrierenden Adsorptionsvorgängen zwischen den markierten und unmarkierten Proteinen ist essentiell für das Verständnis und die Modellierung des intrapartikulären Stofftransports. Im Fall von identischem Adsorptionsverhalten ist das Fluoreszenzintensitätsprofil im Partikelinneren eine Abbildung der Gesamtproteinkonzentration. Im Fall von konkurrierenden Adsorptionsvorgängen müssen zwei oder mehr separate Bilanzen für die unterschiedlichen Proteinspezies aufgestellt werden. Die Frage nach konkurrierenden Adsorptionsvorgängen wurde in vier unterschiedlichen Experimenten untersucht:

- Säulenpulseexperimente im RP-HPLC-Modus
- Säulenpulseexperimente im HI-FPLC Modus
- In-situ Markierungsexperimente von bereits adsorbierten Proteinen
- Messungen von Adsorptionskinetiken und –isothermen im Finite Bath Modus

Die Intention der Pulsretentionsexperimente war es, geeignete Fluorophore für die drei ausgewählten Proteine zu finden, bei denen nach Möglichkeit kein Unterschied im Retentionsverhalten zwischen markierten und unmarkierten Proteinen festzustellen war. Durch die Aufgabe eines Proteinpulses bewegten sich die untersuchten Systeme im linearen Bereich der jeweilig zugrundeliegenden Isothermen. Aufgrund der geringen aufgegebenen Proteinkonzentration bedingt einzig die Interaktionen der Proteinspezies mit den Adsorbentien die Retentionsunterschiede.

5.1 Limitierungen der CLSM Analyse im Finite Bath Modus

RP-HPLC

Bei den Säulenpulsexperimenten im RP-HPLC Modus konnten die unterschiedlichen Hydrophobizitäten der Fluorophore als Einzelmoleküle mittels der verwendeten C18-Säule dargestellt werden. Dabei erwiesen sich die Fluorophore der Cy Familie erwartungsgemäß als hydrophil im Vergleich zu anderen getesteten Fluorophoren. Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten von *Buschmann et. al.* überein [Buschmann et al. 2003]. Bei den RP-HPLC Pulsretentionsexperimenten mit einem Gemisch aus markierten und unmarkierten Proteinen konnte bei nahezu allen getesteten Protein-Fluorophorkonzentrationen kein unterschiedliches Retentionsverhalten auf der C18 Säule festgestellt werden. Die unterschiedlich starke Hydrophobizität der Fluorophore, insbesondere der starke Unterschied zwischen Cy3 / Cy5 und Bodipy FL machte sich nur beim Retentionsverhalten des markierten Proteins BSA bemerkbar, nicht bei den beiden Immunoglobulinen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Fluorophore kovalent an Lysinreste gebunden sind und deswegen hauptsächlich in geladenen Oberflächenregionen des Proteins lokalisiert sind. Die Retention auf der RP-Säule wird allerdings hauptsächlich durch die ungeladenen, weniger hydratisierten Oberflächenregionen bedingt. Die hydrophileren Fluorophore verändern nun die Eigenschaften der ohnehin hydrophilen Oberflächenregionen nicht so stark, als dass das Retentionsverhalten dadurch beeinflusst würde. Bei den hydrophoberen Fluorophoren, wie dem Bodipy FL, ist der Einfluss von der Größe der markierten Proteine abhängig. Alle drei Proteine sind sehr hydrophil, die beiden Immunoglobuline sind allerdings um den Faktor 2,5 größer als BSA. Somit wird das kleinere Protein BSA durch das hydrophobe Fluorophor Bodipy FL in seinem Retentionsverhalten modifiziert, die größeren Immunoglobuline jedoch nicht.

HI-FPLC

Bei den HI-FPLC Experimenten wurde aufbauend auf den RP-HPLC Experimenten lediglich mit dem Fluorophor Cy5 gearbeitet. Bei keinem System konnten Unterschiede in der Bandenretention zwischen markierten und unmarkierten Proteinen festgestellt werden.

5 Diskussion und Ausblick

Somit konnten Systeme, die bei den extremeren Bedingungen der RP-HPLC nicht zwischen markierten und unmarkierten Proteinen aufgetrennt werden konnten, dies auch nicht bei den schwächeren Bedingungen der HI-FPLC.

Unterschiede bei beiden Methoden traten bei den Massenbilanzen auf. Mit zunehmender Konzentration nahm die Proteinwiederfindungsrate für markiertes und unmarkiertes Protein unterschiedlich stark ab, für das Protein BSA z.B. von nahezu gleich starker Abnahme (98% / 96%) bei reiner Pufferlösung zu einer signifikanten Differenz (89 / 71%) bei der verwendeten Maximalkonzentration an NaCl. Das Verhältnis der Massenverluste zwischen markierten und unmarkierten Proteinen einer Proteinlösung war bei den Negativkontrollen, d.h. bei den Tests mit nicht-funktionalisierter, hydroxylierter Sepharose, ähnlich wie bei den funktionalisierten Adsorbentien, obgleich die Wiederfindungsraten insgesamt höher waren. Die stärkere Abnahme des markierten Proteins war somit nicht auf eine Interaktion zwischen Adsorbensliganden und den Protein-Adsorptiva zurückzuführen.

Shallow Bed Modus

Analoge Resultate ergaben sich bei den Sorptionsstudien im Shallow Bed Modus. Allerdings bestand bei diesen Experimenten die Möglichkeit, neben nicht funktionalisierten Adsorbentien auch eine leere Kammer als weitere Negativkontrolle zu verwenden. Dies war bei den HI-FPLC Experimenten nicht möglich, da bei einer leeren Säule eine ‚unendlich grosse Axialdispersion‘, d.h. eine vollständige Durchmischung des Proteinpulses mit dem Säulenvolumen stattfindet. Die ebenfalls hohen Massenverluste bei Durchströmung der leeren Kammer, dem Kontrollexperiment Nr. 2, zeigten, dass der überwiegende Teil der konkurrierenden unspezifischen Adsorptionen von markierten und unmarkierten Proteinen nicht am Rückgrat der Adsorbentien erfolgte. Diese Ergebnisse sind nicht direkt auf die HI-FPLC Experimente übertragbar, da zwar die Schlauchmaterialien identisch waren, jedoch nicht die ‚Säulenbehälter‘.

5.1 Limitierungen der CLSM Analyse im Finite Bath Modus

Finite Bath Experimente

Bei den Finite Bath Experimenten konnte ein potentiell auftretendes Zweikomponentenverhalten des Proteingemisches für die untersuchten Systeme durch Kontrolle des D/P-Verhältnisses vor und nach der Adsorption experimentell ermittelt werden. Dabei ist ebenfalls zu erwähnen, dass für kein untersuchtes System ausschließlich konstante D/P-Werte nach erfolgter Adsorption erhalten werden konnten, sondern in anderen Messungen des formal selben Systems eine verstärkte Abnahme des markierten Proteins erfolgte. Diese Unterschiede im Adsorptionsverhalten müssen in bestimmten veränderten Eigenschaften der Proteinlösungen begründet sein, die hauptsächlich durch Unterschiede in der Vorbereitung der Proteinlösungen bedingt sein müssen und die in Kapitel 5.3.2 diskutiert werden.

In-situ Markierung

Durch die In-Situ Markierung der Proteine im beladenen Zustand konnte der Fall ausgeschlossen werden, dass bei einem kompetitiven Adsorptionsverhalten von markierten und unmarkierten Proteinen das markierte Protein präferentiell in den äußeren Adsorbenschalen bindet und sich in der Partikelmitte hauptsächlich unmarkiertes Protein befindet. Diese zweite, In-Situ Markierung auf den Adsorbentien ergab ein analoges Fluoreszenzintensitätsprofil, wie es durch die konventionell markierten Proteine im ersten Schritt der In-situ Markierungsexperimente erhalten wurde. Durch die korrespondierende Größenausschlusschromatographie konnte verifiziert werden, dass dieses zweite Profil ausschliesslich aus einer kovalenten Bindung der zweiten Fluorophorspezies an die adsorbierten Proteine resultierte.

5.1.3 Fazit für die untersuchten HIC Systeme

Aus der Summe der durchgeführten Experimente konnte somit abgeleitet werden, dass es bei unbeeinflussten, nativen Proteinen in Lösung im linearen Bereich der jeweiligen Adsorptionsisotherme möglich war Fluorophore zu identifizieren, die keinen Unterschied im Adsorptionsverhalten zwischen markierten und

5 Diskussion und Ausblick

unmarkierten Proteinen machten. Die Tatsache, dass sich bei nahezu allen untersuchten Systemen bei stärkeren Adsorptionsbedingungen kein homogener Profilverlauf bei der CLSM einstellte, ist nicht durch kompetitives Adsorptionsverhalten zwischen markierten und unmarkierten Proteinen begründet. Vielmehr bilden die markierten Proteine die geringere Beladungsdichte im Partikelinneren repräsentativ ab.

Generell werden alle verwendeten Proteinlösungen mit zunehmender Salzkonzentration im Adsorptionspuffer anfälliger für Veränderungen ihrer Adsorptionseigenschaften. Hiervon ist der markierte Mengenanteil der Proteine stärker betroffen als der unmarkierte. Eine Konsequenz hieraus ist ein höhere unspezifische Adsorption dieses Anteils, der neben der zuvor erwähnten Salzkonzentrationen auch von den Eigenschaften der Kontaktflächen der verwendeten experimentellen Apparate abhängt. Hierbei ist für die vorliegenden chromatographischen Systeme die ‚spezifische Oberfläche‘, d.h. das Verhältnis von apparativer Kontaktfläche zu verwendetem Adsorbens- aber auch Proteinlösungsvolumen zu minimieren. Somit stellt der Finite Bath Modus den für diese Systeme besten Betriebsmodus dar. Aufgrund der dennoch hohen Fehlerabhängigkeit ist die automatisierte Betriebsweise auf einem Laborroboter zu bevorzugen.

Vergleich der HIC Systeme mit publizierten IEC Systemen

Die wesentlichen Einflussfaktoren, welche die Retentionszeit von Protein-Fluorophor Konjugaten generell beeinflussen können, sind das Größenverhältnis von Fluorophor zu Protein sowie die Ladung und die Hydrophobizität der Fluorophore. Dabei spielt die Ladung eine potentiell größere Rolle bei der IEC, die Hydrophobizität hingegen bei der HIC.

Bei den in Kapitel 4.2.1 dargestellten Ergebnissen der RP-HPLC Studien konnte gezeigt werden, dass die relativen Unterschiede der Fluorophore untereinander in der Hydrophobizität anhand ihrer Retentionszeit auf der C-18 Säule darstellbar sind. Das hydrophobste Fluorophor aus diesen Studien, Bodipy FL, konnte als Konjugat mit BSA die Retentionszeit des markierten Proteins beeinflussen. Bei den beiden größeren Immunglobulinen zeigten sich hingegen unter denselben

5.1 Limitierungen der CLSM Analyse im Finite Bath Modus

experimentellen Bedingungen keine Unterschiede. Für die Pulsretentionsexperimente mit den in dieser Arbeit verwendeten HIC Systemen wurde das hydrophilere Fluorophor Cy5 verwendet, das bei RP-HPLC Experimenten zuvor in keinem der untersuchten Fälle zu Veränderungen in der Retentionszeit von markierten Proteinen führte. Bei den in Kapitel 4.2.1 dargestellten Ergebnissen der HI-FPLC Pulsexperimente wurden bei zunehmend stärkeren Adsorptionsbedingungen zunehmend höhere Retentionszeiten bei zunehmend divergierenden Massenbilanzen erhalten. Allerdings wurde kein Unterschied zwischen markierten und unmarkierten Proteinen festgestellt.

Teske et. al. führten analoge Säulenpuls-Experimente mit IEC Systemen durch [Teske et al. 2005]. Dabei wurden zwei kleine Proteine mit einer Molekularmasse von jeweils unter 15 kDa, Lysozym und α -Lactalbumin, mit vier unterschiedlichen Fluorophoren markiert, die eine Nettoladung von -1, 0 oder +1 aufwiesen. Durch kovalente Bindung der Fluorophore an die bei neutralem pH-Wert positiv geladenen ϵ -Aminogruppen der Lysinreste der Proteine verliert jedes Protein eine positive Ladung pro Markierung. Bei einem eingesetzten D/P-Verhältnis von 0,01 ist von einer hauptsächlich auftretenden Einfachmarkierung der Proteine auszugehen, so dass jedes Protein durch die Markierung in seiner Nettoladung um den Betrag 0, -1 und -2 verändert wurde. Auf einem Kationenaustauschermaterial konnte die Retentionszeit mit zunehmender negativer Nettoladung der Protein-Fluorophorkonjugate sowie mit zunehmender Ionenstärke verringert werden. Die Massenbilanzen waren bei diesen Untersuchungen im Gegensatz zu den in Kapitel 4.2.1 dargestellten Experimenten konvergent. Die korrespondierenden CLSM-Profile, die je nach gewählten Versuchsbedingungen ‚Überschuss-Profile‘ oder auch konkave Profile nach Einstellung des Adsorptionsgleichgewichtes ergaben, konnten in weiterführenden Arbeiten durch ein kompetitives Adsorptionsmodell, d.h. ein Zweikomponenten-System mit der Steric Mass Action (SMA) Isotherme [Brooks et al. 1992] qualitativ beschrieben werden [Teske et al. 2006]. Für das native Protein ergab sich in dem Modell ein homogen gesättigter Adsorbenspartikel. Zudem konnte gezeigt werden, dass neben dem verwendeten Fluorophor auch die Position der Markierung entscheidend für eine Veränderung der Adsorptionseigenschaften im Vergleich zum nativen Protein sein kann [Teske et al. 2007].

5 Diskussion und Ausblick

Festzustellen ist, dass bei diesen sehr genau untersuchten Systemen Abweichungen vom normalen, vom Partikeläußeren zum Partikelinneren mit der Zeit zunehmenden Profil mit homogener Sättigung im Adsorptionsgleichgewicht durch kompetitives Adsorptionsverhalten von markierten und unmarkierten Proteinen bedingt war. Diese Systeme konnten durch Pulsretentionsexperimente identifiziert werden. Im Gegensatz dazu gibt es für die in dieser Arbeit untersuchten Systeme keinen Hinweis auf kompetitives Adsorptionsverhalten auf den Adsorbentien.

5.1.4 Aliquotierung der Adsorbenspartikel für die Finite Bath Messungen

Da es sich bei der Plaqueanlage um eine Eigenentwicklung handelte, waren keine Literaturdaten für die Abschätzung des relativen Fehlers bei der Adsorbensaliquotierung vorhanden. Die relativen Fehler wurden deswegen experimentell bestimmt, was indirekt durch Bestimmung der relativen Standardabweichungen der Adsorbenskapazität im Gleichgewicht geschah.

Voraussetzung für die Anwendbarkeit dieser indirekten Methode ist ein konstanter Extinktionskoeffizient der Proteine in der Flüssigphase sowie eine homogene Funktionalisierung der Adsorbentien mit Liganden. Beide Bedingungen wurden als gegeben vorausgesetzt.

Lysozym wurde in einem 20mM Natrium Acetat Puffer bei pH 5 zusammen mit Adsorbensmaterialien verwendet, die mit dem starken Kationenaustauscherliganden Sulfopropyl funktionalisiert sind (s. **Tabelle 3.3**).

Die Messungen erfolgten im automatisierten Finite Bath Modus im 96er Format wie in Kapitel 3.2.4 dargestellt. Bei Vermessung einer reinen Proteinlösung ohne vorherige Inkubation mit Adsorbentien ist der erhaltene Messfehler auf drei zufällige Messfehlerquellen zurückführbar:

- (i) Der Pipettierfehler beim Einfüllen der Flüssigkeit in die Mikrogefäße der UV-Messplatte führt zu unterschiedlich hohen Flüssigkeitsmenisken und damit zu unterschiedlich hohen Absorptionswerten, die nicht durch die Weglängenkorrektur des Photometers ausgeglichen werden können.
- (ii) Ungleichheiten im Material bei den UV-Messplatten

5.1 Limitierungen der CLSM Analyse im Finite Bath Modus

- (iii) Inhärente Fehler im optischen System des Photometers wie z.B. ein nicht exakt orthogonal zum Probengefäß ausgerichteter Strahlengang.

Das Zusammenwirken aller drei Fehler ergibt den Messfehler $\varphi_{\text{Messung, Referenz}}$ in (64) für die Bestimmung der Proteinkonzentration c_{Messung} der Proteinreferenzlösungen mit der initialen, unveränderten Konzentration c_0 .

$$c_{\text{Messung}} = c_0 + \varphi_{\text{Messung, Referenz}} \quad (64)$$

Die Konzentration ist gemäß dem Gesetz nach Lambert-Beer, dargestellt in (36), innerhalb eines bestimmten Bereiches direkt proportional der Absorption. Die relative Standardabweichung von jeweils 96 Einzelmessungen einer bestimmten Proteinkonzentration, bzw. eines bestimmten Absorptionswertes hängt von der Höhe dieses Wertes ab, wie in **Bild 5.1** dargestellt.

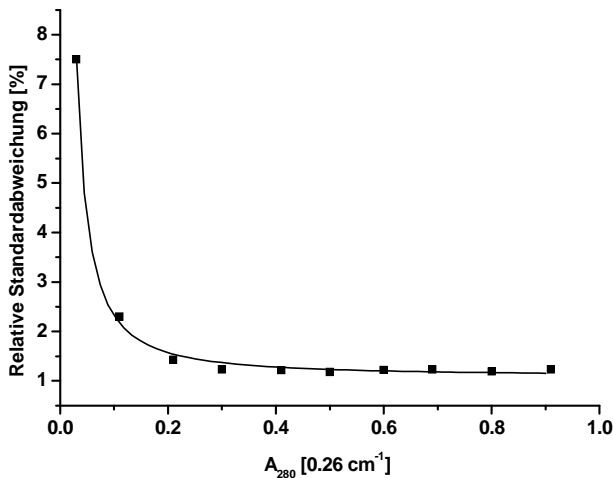


Bild 5.1: Relative Standard-abweichung als Funktion der Absorptionswerte bei 280nm

Eine UV-Messplatte im 96er Format wurde mit jeweils 100 µl Lysozym Lösung pro Well befüllt und die Absorption bei 280nm gemessen. Pro Platte wurde eine bestimmte Konzentration verwendet und aus den 96 Messwerten die relative Standardabweichung berechnet. Diese ist gegen den mittleren Absorptionswert der jeweiligen Messung aufgetragen

5 Diskussion und Ausblick

Bei der Vermessung von reiner Pufferlösung ist die relative Standardabweichung mit über 7% am größten. Materialungleichheiten im Messplattenboden und Abweichungen im Auftreffwinkel des Lichtstrahls auf die Probe haben bei geringen mittleren Absorptionswerten den größten Einfluss. Mit zunehmender Proteinkonzentration nimmt dieser Wert zunächst exponentiell ab und nähert sich einem konstanten Wert von ca. 1,2% für einen Absorptionsbereich von 0,2 bis 1,0 ($0,26 \text{ cm}^{-1}$).

Wird nun anstatt der reinen Proteinlösung c_0 der Überstand nach erfolgter Einstellung des Adsorptionsgleichgewichts, c^* , vermessen, fließen zwei weitere Fehlerquellen in die 96-fache Messung der Proteinkonzentration, c_{Messung} , ein:

- (iv) Der Pipettierfehler φ_B beim Flüssigkeitstransfer der Adsorptivlösung, d.h. der Bulk-Flüssigphase, V_B in die Mikroreaktionsgefäße.
- (v) Schwankungen φ_{Ads} im Adsorbensvolumen V_{Ads} der hergestellten Adsorbensplaques mit ansonsten konstanter spezifischer Kapazität im Adsorptionsgleichgewicht q^* .

Die Summe aus den Fehlerquellen (i) – (v) ergibt den Messfehler $\varphi_{\text{Messung, Überstand}}$. Abgeleitet aus der Massenbilanz zur Bestimmung der Adsorbenskapazität, dargestellt in (58), ergibt sich für die gemessene Proteinkonzentration c_{Messung} , bzw. den gemessenen Absorptionswert in der Flüssigphase nach (65):

$$c_{\text{Messung}} = c^* = c_0 - q^* \frac{V_{\text{Ads}}}{V_B} \quad (65)$$

Unter Einbeziehung aller möglichen Fehlerquellen und (64) ergibt sich (66):

$$c_{\text{Messung}} = c^* + \varphi_{\text{Messung, Überstand}} = c_0 - q^* \frac{V_{\text{Ads}} + \varphi_{\text{Ads}}}{V_B + \varphi_B} + \varphi_{\text{Messung, Referenz}} \quad (66)$$

Die Fehlerfortpflanzung für den rechten Term in (66) kann allgemein nach dem Gesetz von Gauss beschrieben werden. Die differentielle Änderung einer Größe ξ in Abhängigkeit von den Größen ζ_1 , ζ_2 und ζ_3 beträgt demnach nach (67):

5.1 Limitierungen der CLSM Analyse im Finite Bath Modus

$$d\xi = df\left(\frac{\varsigma_1}{\varsigma_2} + \varsigma_3\right) = \frac{\partial \xi}{\partial \varsigma_1} d\varsigma_1 + \frac{\partial \xi}{\partial \varsigma_2} d\varsigma_2 + \frac{\partial \xi}{\partial \varsigma_3} d\varsigma_3 = \frac{1}{\varsigma_2} d\varsigma_1 + \frac{\varsigma_1}{\varsigma_2^2} d\varsigma_2 + d\varsigma_3 \quad (67)$$

Betrachtet man den Differenzen- anstatt des Differentialquotienten ergibt sich (68), bzw. (69).

$$\Delta \xi = \Delta f\left(\frac{\varsigma_1}{\varsigma_2} + \varsigma_3\right) \approx \sqrt{\left(\frac{\partial f}{\partial \varsigma_1}\right)^2 \Delta \varsigma_1^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial \varsigma_2}\right)^2 \Delta \varsigma_2^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial \varsigma_3}\right)^2 \Delta \varsigma_3^2} \quad (68)$$

$$\Delta \xi \approx \sqrt{\frac{1}{\varsigma_2^2} \Delta \varsigma_1^2 + \frac{\varsigma_1^2}{\varsigma_2^4} \Delta \varsigma_2^2 + \Delta \varsigma_3^2} = \sqrt{\frac{\varsigma_1^2}{\varsigma_2^2} \left(\frac{(\Delta \varsigma_1)^2}{\varsigma_1^2} + \frac{(\Delta \varsigma_2)^2}{\varsigma_2^2} \right) + \Delta \varsigma_3^2} \quad (69)$$

Ist die Proteinkonzentration in der Flüssigphase nach erfolgter Einstellung des Adsorptionsgleichgewichts c^* vom Betrag nach gleich der unveränderten Konzentration der Referenzlösung c_0 , so kann $\Delta \xi$ mit $\varphi_{\text{Messung, Überstand}}$, $\varsigma_1 / \Delta \varsigma_1$ mit $V_{\text{Ads}} / \varphi_{\text{Ads}}$, $\varsigma_2 / \Delta \varsigma_2$ mit V_B / φ_B und $\Delta \varsigma_3$ mit $\varphi_{\text{Messung, Referenz}}$ substituiert werden. Für (69) ergibt sich folgender in (70), bzw. (71) beschriebener Zusammenhang.

$$\varphi_{\text{Messung, Überstand}} = -\sqrt{q^{*2} \frac{V_{\text{Ads}}^2}{V_B^2} \left(\frac{\varphi_{\text{Ads}}^2}{V_{\text{Ads}}^2} + \frac{\varphi_B^2}{V_B^2} \right) + \varphi_{\text{Messung, Referenz}}^2} \quad (70)$$

$$\varphi_{\text{Messung, Überstand}}^2 - \varphi_{\text{Messung, Referenz}}^2 = q^{*2} \frac{V_{\text{Ads}}^2}{V_B^2} \left(\frac{\varphi_{\text{Ads}}^2}{V_{\text{Ads}}^2} + \frac{\varphi_B^2}{V_B^2} \right) \quad (71)$$

Aufgelöst nach φ_{Ads} ergibt sich (72).

$$\varphi_{\text{Ads}} = \sqrt{\left(\varphi_{\text{Messung, Überstand}}^2 - \varphi_{\text{Messung, Referenz}}^2 \right) \frac{V_B^2}{q^{*2}} - \varphi_B^2 \frac{V_{\text{Ads}}^2}{V_B^2}} \quad (72)$$

Für die Herstellung der Adsorbensplaques wurden insgesamt drei Schablonen mit unterschiedlichen Lochmasken verwendet, zwei im Prototyp und eine im

5 Diskussion und Ausblick

Serienmodell. Eine Aliquotierung mittels einer 8-Kanalpipette wurde als Referenzversuch durchgeführt, wie in **Tabelle 5.1** dargestellt.

Tabelle 5.1: Verwendete Adsorbermaterialien und Apparate zur Herstellung der Adsorbieralliquots.

¹⁾ Vgl. Kapitel 3.2.4; M 8 KP: Manuelle 8-Kanalpipette, PT: Prototyp, M: Lochmaske, SM: Serienmodell ²⁾ Vgl. **Tabelle 3.3**; SP S FF: Sulphopropyl-Sepharose Fast Flow ³⁾ Herstellerangabe, mittlerer Partikeldurchmesser ⁴⁾ Berechnet aus dem Zylindervolumen der Lochmaske unter Annahme eines Lückengrades von 0,37 [Brauer 1971]

Exp.- Nr.	Apparat ¹⁾	Adsorber- material ²⁾	d _{Partikel}	V _{Zylinder} ¹⁾ [μl]	V _{Adsorber} ⁴⁾ [μl]
I	M 8-KP	SP S FF	90 ³⁾	15.0	9.5
II	PT, M 1	SP S FF	90 ³⁾	8.0	5.0
III	PT, M 2	SP S FF	90 ³⁾	15.1	9.5
IV	SM, M 1	SP S FF	90 ³⁾	7.7	4.8

Es wurden jeweils zwei verschiedene Proteinkonzentrationen verwendet. Der Pipettierfehler der 8-Kanalpipette sowie des Roboters lag bei 0,4 %. Die Resultate für jeweils eine Konzentration sind in **Tabelle 5.2** dargestellt und stimmen mit denen der zweiten Konzentration überein.

Tabelle 5.2: Relative Standardabweichungen der unterschiedlichen Adsorbensplaque-Volumina

¹⁾ Vergleich **Tabelle 5.1** ²⁾ Lysozymkonzentration nach Einstellung des Adsorptionsgleichgewichts ³⁾ Mittlere Absorptionswerte bei 280 nm ⁴⁾ Relative Standardabweichung der Proteinkonzentrationen nach erfolgter Einstellung des Adsorptionsgleichgewichts ⁵⁾ Relative Standardabweichung der Referenz-Proteinlösungen ⁶⁾ Relative Standardabweichung des Adsorbensvolumens.

Exp.- Nr. ¹⁾	c _{Adsorptiv} ²⁾ [mg ml ⁻¹]	A _{280, mittel} ³⁾ [0,26 cm ⁻¹]	Φ _{M, Eq} ⁴⁾ [%]	Φ _{M, R} ⁵⁾ [%]	Φ _{Ads} ⁶⁾ [%]
I	2,5	0,42	42,42	1,26	6,08
II	2,0	0,68	4,69	1,17	1,97
III	2,5	0,42	8,36	1,26	1,12
IV	1,5	0,38	6,39	1,28	1,56

Unabhängig von dem verwendeten Modell der Plaqueanlage wird eine relative Standardabweichung von ≤ 2% erreicht.

5.1 Limitierungen der CLSM Analyse im Finite Bath Modus

5.1.5 Normierung der Radien der direkt analysierten Partikel

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten HIC Adsorbentien basierten auf einem Sepharose-Rückgrat mit einer Partikelgrößenverteilung von ca. 60 – 135 μm im Durchmesser. Bei der CLSM-Analyse der Adsorbentien, in Kapitel 3.2.4 dargestellt, wurde bei der Fokussierung auf einen Partikel dessen Durchmesser mit einer Funktion der Analysesoftware bestimmt. Für die Messung der Fluoreszenzintensitätsprofile wurden dabei lediglich Partikel mit einem Durchmesser von 88 – 96 μm verwendet, so dass der normierte Radius für Datenanpassung an die Porendiffusionsmodelle aus Werten zwischen 44 – 48 μm gebildet wurde. Die untersuchten chromatographischen Systeme wurden anhand der ermittelten Parameter des Erweiterten Porendiffusionsmodells, beispielhaft in Kapitel 4.3.2 dargestellt, klassifiziert. Die Unterschiede in den Parametern des erweiterten Porendiffusionsmodells wurden für zwei chromatographische Systeme, BSA mit Butyl-Sepharose in Adsorptionspuffer mit 1,25 M oder 5 M Natriumchlorid, für zwei Partikelradien experimentell bestimmt und sind in **Tabelle 5.3** dargestellt.

Tabelle 5.3: Parameter des erweiterten Porendiffusionsmodells für jeweils zwei Partikelradien von zwei chromatographischen Systemen

¹⁾ Untersuchtes chromatographisches System: BSA, Butyl-Sepharose FF, Adsorptionspuffer, pH 7, mit 1,25 M oder 5 M NaCl, vgl. **Tabelle 3.4**; ²⁾ Partikeldurchmesser; ³⁾ Modellparameter des erweiterten Porendiffusionsmodells, dargestellt in Kapitel 2.2.2; ^{*)} Daten dargestellt in **Tabelle 6.1**, kleinere Partikelradien wurden bei der CLSM Analyse häufiger vorgefunden

System ¹⁾	d_p ²⁾ [μm]	q_m ³⁾ [mM]	k_a ³⁾ [mM ⁻¹ s ⁻¹]	γ_{enfalted} ³⁾ [mM ⁻¹]	γ_{nativ} ³⁾ [mM ⁻¹]	n ³⁾ [1]
BUBSA SC125 ^{*)}	44,6	0,11	0,21	4,7	1558	10,3
BUBSA SC125	48,3	0,11	0,20	4,6	1574	10,1
BUBSA SC500 ^{*)}	44,2	0,56	0,37	9,9	6222	10,5
BUBSA SC500	47,4	0,53	0,34	9,8	6513	10,2

5 Diskussion und Ausblick

Für diese beiden untersuchten Systeme gilt, dass der Einfluss des Normierungsfehlers bei homogener beladenen Partikeln schwächer ist als bei stark konkaven Profilen. Im Wesentlichen wurden zwei Parameter, die Adsorptionsraten k_{ads} und die Hinderungsparameter γ_{nativ} stärker beeinflusst. Bei der Normierung und Datenanpassung an das Modell ergaben sich für den kleineren Partikel höhere Werte für die Adsorptionsrate und niedrigere Werte für den Hinderungsparameter des nativen Proteins. Die Maximalkapazitäten q_m , die Hinderungsparameter des entfalteten Proteins γ_{entf} sowie die Strukturparameter n blieben nahezu unverändert. Die Variationen bei den Parametern waren bei diesem System zu gering, um die in **Tabelle 6.1** erhaltenen Trends zu widerlegen. Eine exakte Bestimmung der systematischen Fehler, die den Parametern aufgrund der Variabilität der zugrunde liegenden Partikelradien anhaftet, ist aufgrund der Komplexität der gekoppelten Differential- und algebraischen Gleichungen nicht möglich. Im Folgenden werden die qualitativen Auswirkungen der Normierungsfehler auf die Modellparameter diskutiert. Die Anpassung der Simulationsergebnisse an die Messdaten erfolgte durch Iteration der folgenden Modellparameter:

Die Hinderungsparameter γ_{nativ} / $\gamma_{\text{entfaltet}}$ und die Adsorptionsrate k_{ads}

Die Diffusion von gelösten Proteinen in der Porenflüssigkeit wird durch Proteine, die bereits an der Adsorbenswand adsorbiert sind, behindert. Die beiden Hinderungsparameter γ quantifizieren das Ausmaß der Behinderung, d.h. der Verlangsamung der Diffusion und damit auch der Verzögerung der Proteinbeladung der inneren Adsorbensschalen. Lediglich die Veränderung der Proteinbeladung in der äußersten Adsorbensschale bleibt unbeeinflusst von den beiden Parametern. Der Hinderungsparameter der nativen Proteine γ_{nativ} ist zudem eine Funktion der relativen Beladung bezogen auf die Maximalkapazität.

Die Hinderungsparameter sind als Faktoren direkt multiplikativ mit dem ungehinderten Diffusionskoeffizienten verknüpft, der als Koeffizient den Transport von Menge Adsorptiv pro Zeiteinheit und Fläche beschreibt. Somit sind die Variationen in der zugänglichen Oberfläche für jedes normierte Schalenelement zwischen 0 und 1 der entscheidende Einflussfaktor.

5.1 Limitierungen der CLSM Analyse im Finite Bath Modus

In **Bild 5.2** ist der Einfluss der Radienvariabilität auf die zugängliche Kugelfläche graphisch verdeutlicht.

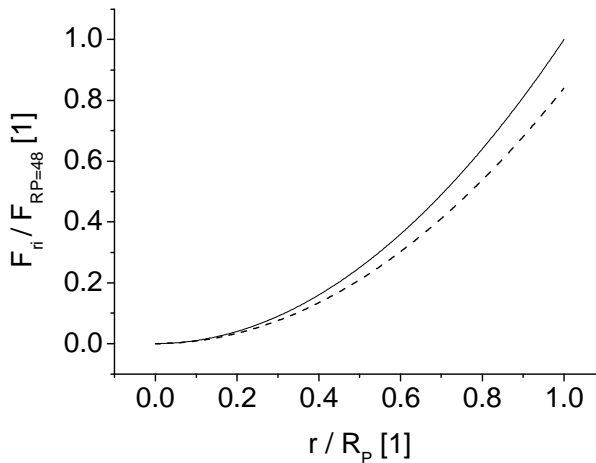


Bild 5.2: Relative Unterschiede bei den radienspezifischen Kugelschalenflächen zwischen Partikeln mit einem Radius von 44 μm (- - -) und 48 μm (—)

Die normierte radienspezifische Schalenfläche ist über den normierten Partikelradien aufgetragen. Die Schalenfläche wurde mit den jeweiligen Absolutwerten errechnet und dann auf die maximale Schalenfläche des 48 μm Partikels normiert. Die Radien beider Partikel wurden jeweils auf ihren Partikelrand R_p normiert.

In den äußeren Adsorbenssschalen zwischen 0,75 und 1 r/R_p betragen die Unterschiede in den Schalenflächen 10 – 16%. Wie bereits oben erwähnt ist der Massen- oder Mengentransport allgemein als Masse/Menge Material pro Zeiteinheit pro Fläche definiert. Bei gleichen Adsorptionsbedingungen, d.h. gleicher Triebkraft des Adsorptionsprozesses ist die zugängliche Fläche für den Massentransport in diesen maßgeblichen äußeren Adsorbenssschalen bei dem 44 μm Partikel um 10 – 16 % kleiner, was den Transport bei ansonsten gleicher Diffusionsbehinderung durch adsorbierte Proteine und gleichen Adsorptionsraten an die Porenwände beschleunigt erscheinen lässt. Somit hat der maßgebliche

5 Diskussion und Ausblick

Hinderungsparameter γ_{nativ} bei kleineren Partikeldurchmessern scheinbar niedrigere Werte.

In analoger Betrachtungsweise hat die Adsorptionsrate k_{ads} bei kleineren Partikeldurchmessern scheinbar höhere Werte. Die Adsorptionsrate bestimmt die Schnelligkeit, mit der die Proteinbeladung der Adsorbenswände stattfindet. Sie hängt nach der klassischen Vorstellung nach *Langmuir* wie in (1) dargestellt lediglich von der Verfügbarkeit freier Adsorbensplätze und der Proteinkonzentration in der Porenflüssigkeit ab, die in der jeweiligen radialen Position vorhanden ist.

Die maximale Kapazität q_{max}

Die maximale Kapazität ist neben der Adsorptionsrate ein wesentlicher Einflussfaktor für die zeitliche Änderung der Proteinbeladung. Klassische Isothermenexperimente mit reiner Flüssigphasenanalyse liefern eine maximale Kapazität unter der Annahme eines homogen beladenen Partikels. Bei stark konkaven Konzentrationsprofilen, d.h. stärkerer Beladung der äußeren Adsorbenschalen liefern diese klassischen Isothermenexperimente einen über das Adsorbensvolumen gemittelten Wert. Da dieser Wert niedriger ist als die maximale Kapazität am Partikelrand, der mit der Konzentration der Bulk-Flüssigphase gekoppelt ist, kann das Modell die hohen Proteinbeladungen am Partikelrand mit diesem Wert nicht abbilden. Dieses Problem konnte nur dadurch umgangen werden, dass die maximale Kapazität ebenfalls aus den intrapartikulären Konzentrationsprofilen abgeschätzt wurde.

Generell betrachtet ist die Maximalkapazität eine volumenspezifische Größe und somit ist der Fehler der Volumenberechnung direkt proportional zu dem Fehler der Kapazitätsberechnung. Bei der Kopplung der Bulk-Flüssigphasenkonzentration mit der äußersten Adsorbensschale, die in (22) dargestellt ist, ist die volumenspezifische Oberfläche $3/R_p$ die für die Proteinkonzentration in den Poren der äußersten Adsorbensschale entscheidende Größe.

Da die Maximalkapazitäten q_{max} aus den Isothermenmessungen aus zuvor genannten Gründen nicht verwendet wurden und die Parameter stattdessen aus den

5.1 Limitierungen der CLSM Analyse im Finite Bath Modus

intrapartikulären Konzentrationsprofilen erfolgte, verändert sich der Einfluss des variablen Partikelradius dadurch signifikant. Die unterschiedlichen absoluten Volumina der variabel großen Partikel, in deren Berechnung die Radienverteilung zwischen $44\text{ }\mu\text{m}$ und $48\text{ }\mu\text{m}$ in dritter Potenz eingeht, spielen für die Bestimmung von q_{max} keine Rolle. Vielmehr erfolgt eine Kopplung der je nach System unterschiedlichen Bulk-Flüssigphasenkonzentration an den Einheitsradius nach der Normierung. Somit ist bei diesem Verfahren eine potentielle Variabilität der Fluoreszenzintensität am Partikelrand entscheidend für den systematischen Fehler bei der Bestimmung von q_{max} .

Ein solcher Zusammenhang zwischen der Höhe der Fluoreszenzintensität und einer Variation des Partikelradius in einem Bereich zwischen $44\text{ }\mu\text{m}$ und $48\text{ }\mu\text{m}$ ist bei den in **Tabelle 6.1** dargestellten Systemen nicht erkennbar und ist auch generell theoretisch schwer darstellbar. Die Beladung in der äußersten Adsorbensschale selbst, d.h. in der ca. $0,29\text{ }\mu\text{m}$ starken Zone, sollte bei Finite Bath Experimenten mit einer homogen Bulk-Flüssigphasenkonzentration innerhalb des betrachteten Größenbereiches nicht vom Radius abhängig sein, da dieser Radius eine ganz andere räumliche Dimension beschreibt und nicht direkt den Phasenübergang an einer spezifischen Position auf der Adsorbensschale beeinflusst. Beeinflusst wird allerdings die Geschwindigkeit, mit der sich die Fluoreszenzintensität ins Partikelinnere ausbreitet, d.h. die Signalstärke in den weiter innen liegenden Schalen. Dieser Unterschied spielt allerdings für die Ermittlung von q_{max} keine Rolle.

Basierend auf dieser Annahme sollte die Differenz in den Schalenvolumina, die zwischen den Partikelradien von $44\text{ }\mu\text{m}$ und $48\text{ }\mu\text{m}$ 23% beträgt, nicht ins Gewicht fallen und die maximale Kapazität q_{max} mit diesem zuvor geschilderten Ermittlungsverfahren unbeeinflusst von den variablen Partikelradien innerhalb der genannten Grenzen sein.

5.2 Aussagekraft der CLSM für die Charakterisierung von HIC-Systemen

Die intrapartikulären Konzentrationsprofile aus der CLSM Analyse konnten lediglich unter Berücksichtigung von zwei strukturellen Zuständen der adsorbierten Proteine mit der einhergehenden Behinderung des Massentransports beschrieben werden. Diese Berücksichtigung zweier struktureller Zustände ergab einen Strukturparameter, dessen Aussagekraft im Folgenden ebenfalls diskutiert werden soll.

5.2.1 Wertigkeit der CLSM Daten und des Erweiterten Porendiffusionsmodells für die Charakterisierung von HIC Systemen

Kapazität und Geschwindigkeit des Adsorptionsschritts

Als Beispielsysteme wurden in dieser Arbeit für das Protein BSA und zwei Antikörper typische HIC-Prozessparameter, Adsorbenstyp sowie Salzart und Salzstärke getestet.

Die einfache Anpassung der Flüssigphasendaten aus den Isothermen- und Kinetikmessungen an das Modell nach *Langmuir* erlaubte deren Klassifizierung bezüglich Adsorptionsraten und Bindungskapazitäten. Eine analoge Klassifizierung wurde für qualifizierte Systeme anhand der Transportparameter des Erweiterten Porendiffusionsmodells durchgeführt. Beim Vergleich beider Vorgehensweisen ergaben sich für die Rangfolge der verschiedenen chromatographischen Systeme keine Unterschiede. Somit konnte für diese Systeme eine Einordnung bezüglich optimaler Adsorptionsbedingungen auch durch eine reine Flüssigphasenanalyse erfolgen, da sie für diesen Zweck denselben Informationsgehalt wie die aufwendigere, zusätzliche direkte Analyse hatte.

5.2 Aussagekraft der CLSM für die Charakterisierung von HIC Systemen

Evaluierung der unterschiedlichen Adsorptionsphänomene

Von den untersuchten 80 Systemen konnten für 53 % Systeme Ergebnisse erhalten werden, die die Randbedingungen für die Anwendbarkeit des erweiterten Porendiffusionsmodells auf die experimentellen Ergebnisse erfüllten: In beiden Negativkontrollen der Finite Bath Messungen blieben die Massenverluste innerhalb der definierten Toleranzgrenzen von 10% und die erhaltenen Messdaten ließen sich in einem Radiusbereich von $0,2 < R_p < 1$ durch das erweiterte Porendiffusionsmodell, siehe Kapitel 2.2.2, mit einer Regressionsgüte von $\geq 0,85$ beschreiben. Wie in Kapitel 4.2.3 dargestellt, waren die Ergebnisse auch bei den 42 Systemen, welche die Kriterien in einer Messung erfüllten, für ein formal gleiches chromatographisches System heterogen. Die unterschiedlichen Profile konnten drei Kategorien zugeordnet werden, bei denen potentiell drei unterschiedliche Interaktionsphänomene der Protein-Adsorptiva die Adsorptionsreaktion dominierten.

Profile der Kategorie 1 zeigten eine sehr starke Bindung des markierten Proteins ausschließlich in den äußeren Adsorbenschalen. Die Konzentrationsabnahme in der Flüssigphase war für die markierten Proteine stärker als für die nicht markierten. Durch die vergleichsweise geringe Abnahme bei den korrespondierenden Negativkontrollen ergeben sich zwei Erklärungsansätze, potentiell auch eine Kombination von beiden:

In einem ersten Erklärungsansatz kam es bei den Proteinen in der Lösung zu Agglomerationen und / oder partiellen Entfaltungen, womit sich gleichzeitig auch die Adsorptionseigenschaften dieser neuen Adsorptiv-Spezies veränderten. Das resultierende Profil mit exklusiver Beladung der äußersten Schalen ist somit das Resultat eines kompetitiven Adsorptionsvorgangs. Die Agglomerationsreaktion wurde entweder durch die Markierung begünstigt, so dass präferentiell Agglomerate aus markierten Proteinen entstanden. Oder die Agglomerationstendenz war unabhängig vom Markierungsgrad und die Mehrzahl der markierten Proteine wurde schlicht aufgrund ihres mengenmäßigen Unterschusses erfasst.

Eine Identifizierung von Agglomeraten und/oder partiellen Entfaltungen ist mit der hier verwendeten CLSM-Analysemethode nicht durchführbar und muss durch alternative Analysemethoden ergänzt werden. Messungen mit Dynamischer

5 Diskussion und Ausblick

Lichtstreuung (engl. Dynamic Light Scattering, DLS) können Dimerbildung durch Verschiebung einer Mischbande darstellen, allerdings muss hierbei auf die Markierung mit einem Fluorophor verzichtet werden. Die oben aufgeführte zweite Hypothese der potentiellen Agglomeratbildung könnte potentiell mit dieser Methode aufgeklärt werden. Eine Veränderung der Proteinstruktur kann potentiell mit spektroskopischen Methoden erfolgen, die den Anteil bestimmter Sekundärstrukturen bei Proteinen analysieren können. Eine mögliche Option ist dabei die Raman-Spektroskopie, die potentiell den Sekundärstrukturanteil der Proteine sowohl in Lösung als auch im adsorbierten Zustand bestimmen und somit auch Veränderungen aufzeigen kann.

In einem zweiten Erklärungsansatz veränderte sich die Proteinstruktur der Proteine nach der Adsorption, so dass es in den äußeren Adsorbenssschalen zu einem ‚Fouling-Prozess‘ kam. Unter Annahme dieser Hypothese und bei angenommener gleicher Affinität von markierten und unmarkierten Proteinen zu den hydrophoben Adsorbentien sollte sich in diesem Fall die Gesamtkapazität der Adsorbentien verringern, was bei den entsprechenden Shallow Bed und Finite Bath Experimenten nicht beobachtet werden konnte. Allerdings waren bei den Shallow Bed Experimenten die erhaltenen Profile nicht mehr vollständig eluierbar (Daten nicht gezeigt), so dass eine Kombination aus beiden Effekten am plausibelsten erscheint.

Profile der Kategorie 2 hatten insgesamt eine schwache Intensität, was zusammen mit den hohen Massenverlusten bei den korrespondierenden Negativkontrollen auf unspezifische Adsorption abseits der Adsorbentien schließen lässt. Die Massenverluste waren bei den Shallow Bed Experimenten wesentlich höher als bei den Finite Bath Experimenten und bei beiden experimentellen Ansätzen bewirkte das nicht-funktionalisierte Adsorbens keinen signifikanten Zuwachs bei den Massenverlusten. Für die unspezifische Adsorption an die verwendeten Materialoberflächen gelten prinzipiell dieselben beiden Erklärungsansätze, die bereits oben dargestellt sind, allerdings sollten sie hier in extremerer Ausprägung auftreten.

Generell ist festzustellen, dass die CLSM Analytik allein nicht geeignet ist, die unterschiedlichen Adsorptionsphänomene in der HIC a priori zu untersuchen. Lediglich durch Erhalt von auswertbaren Datensätzen können Rückschlüsse auf die Abweichungen vom auswertbaren Verhalten gezogen werden. Die hier

5.2 Aussagekraft der CLSM für die Charakterisierung von HIC Systemen

eingeführten Randbedingungen für die Auswertbarkeit von experimentellen Daten können somit lediglich nicht auswertbare Datensätze identifizieren und lassen keine weitergehenden Rückschlüsse zu.

Der Strukturparameter n des Erweiterten Porendiffusionsmodells und seine potentielle Verwendung

In dem erweiterten Porendiffusionsmodell erfolgt die Stofftransportbehinderung gemäß (21) durch eine Verminderung des idealen Diffusionskoeffizienten in freier Lösung. Der die Verminderung bewirkende Term setzt sich additiv aus den beiden Hinderungsparametern für natives, bzw. entfaltetes Protein zusammen. Beide Hinderungsparameter werden mit dem jeweiligen simulierten Mengenanteil der entsprechenden Konformation, bzw. Konfiguration multipliziert. Somit kommt dem Mengenanteil an nativem Protein x_{nativ} die zentrale Rolle für die Transportbehinderung zu, da durch diesen Faktor der Einfluss des nativen Hinderungsparameters γ_{nativ} gesteuert wird, der seinerseits um den Faktor 1000 höher ist als sein für den entfalteten Zustand stehendes Analogon $\gamma_{\text{entfaltet}}$. Der Mengenanteil x_{nativ} wird als Funktion der fraktionellen Beladung ausschließlich durch den Exponent n aus (19) bestimmt, der den intrapartikulären Konzentrationsverlauf an nativem Protein bestimmt.

Für jedes chromatographische System muss potentiell zunächst ermittelt werden, ob es sich bei der für den Massentransport stärker hinderlichen Konformation um eine unterschiedlich geartete Anordnung auf der Adsorbensoberfläche handelt oder um eine partielle Enfaltung der adsorbierten Proteinmoleküle.

Eine unterschiedliche Anordnung von Lysozym in Abhängigkeit vom Beladungsgrad wurde von *Dismer et. al.* für IEC-Systeme postuliert, wonach Lysozym mit zunehmender Beladung eine geringere Kontaktfläche mit der Adsorbensoberfläche hat [Dismer et al. 2008]. Analoge Studien für HIC Systeme sind nicht bekannt.

Hinweise auf partielle Entfaltung während der Adsorption in der HIC wurden von vielen Autoren gefunden und werden im folgenden Kapitel 5.2.2 diskutiert. Kleine, instabile Proteine standen in besonderem Fokus der Untersuchungen, dabei konnte eine verstärkte Enfaltung dieser Proteine konnte mit zunehmender

5 Diskussion und Ausblick

Salzkonzentration, speziell an Ammoniumsulfat, sowie mit hydrophoberen Adsorbentien nachgewiesen werden.

Ergäbe sich ein experimentell verifizierter Zusammenhang zwischen dem Strukturparameter n und Strukturbeeinträchtigungen durch Entfaltungsprozesse während der Adsorption, so würde n einen Qualitätsparameter für das Produkt in dem jeweiligen Aufreinigungsschritt darstellen. Prozessbedingungen könnten in der HIC neben dem klassischen Ziel einer optimalen Raum-Zeit-Ausbeute auch hinsichtlich eines maximalen Anteils an nativem Protein optimiert werden.

Für die in dieser Arbeit untersuchten und mit dem Erweiterten Porendiffusionsmodell analysierbaren Systeme wird eine unterschiedliche Anordnung der Proteine auf der Adsorbensoberfläche postuliert. In Analogie zu den von *Dismer et. al.* (s.o.) erhaltenen Ergebnissen ordnen sich die Proteine bei hoher Beladung dergestalt an, dass die Kontaktfläche mit der Adsorbensoberfläche geringer ist. Strukturelle Entfaltungen spielen hiernach lediglich eine untergeordnete Rolle. Dies hat folgende Gründe:

Der Zusammenhang zwischen verstärkter struktureller Entfaltung von kleinen, instabilen Proteinen und einer steigenden Konzentration an Ammoniumsulfat ist von einer Vielzahl von Autoren experimentell belegt worden (vgl. Kapitel 5.2.2). Die hier erhaltenen Trends zeigen für die analysierbaren 42 Systeme genau gegenteilig den eindeutigen Zusammenhang zwischen der Salzart Ammoniumsulfat und einem hohen Mengenanteil der sterisch stärker hindernden Anordnung der Proteine im adsorbierten Zustand. Zwar konnten *Fogle et. al.* ein kleines, instabiles Protein bei hoher Beladung strukturell stabilisieren, dies galt allerdings erst ab relativen Beladungen von mehr als 90% der Maximalbeladung und gibt somit die hier erhaltenen Ergebnistrends nicht wieder [Fogle et al. 2006]. Bei den verwendeten Proteinen BSA, Mab01 und Mab02 handelt es sich um stabilere Proteine als die oben erwähnten Modellproteine, die für die ‚Destabilisierungsexperimente‘ eingesetzt wurden. Ein Kriterium für die Stabilität eines Proteins ist nach *Jones et. al.* die Schmelztemperatur, die bei stabilen Proteinen über 50°C liegt [Jones et al. 2004]. Für BSA ist dies nach *Arakawa et. al.* mit 54°C der Fall [Arakawa et al. 1999]. Für die beiden Antikörper sind keine Daten verfügbar.

Jones et. al. (s.o.) untersuchten den Effekt der Adsorption of HIC Adsorbentien auf die strukturellen Eigenschaften von drei stabilen Proteinen: Lysozym,

5.2 Aussagekraft der CLSM für die Charakterisierung von HIC Systemen

Ovalbumin und Chymotrypsinogen A. Mittels Deuterium Austauschexperimenten konnten keine Veränderungen in der Proteinstruktur festgestellt werden. *Jungbauer et. al.* postulierten anhand von Pulsretentionsexperimenten zwar eine strukturelle Veränderung von BSA bei der Adsorption von BSA auf zwei ähnlichen HIC-Adsorbentien, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, allerdings nahmen sie bei diesem Protein eine geringe, partielle Entfaltung mit sehr schneller Rückfaltungskinetik nach erfolgter Elution an [Jungbauer et al. 2005]. Aus diesem Grund sollte die strukturelle Veränderung von BSA nicht zu gravierend sein und aufgrund der Größe von 67 kDa sollte dies keinen sehr großen Effekt auf die räumliche Ausdehnung der Moleküle haben. Daraus folgt, dass die Anordnung auf der Adsorbensoberfläche den größten Effekt haben sollte. Wie in Kapitel 5.2.2 ausführlicher diskutiert, verwendeten *Jungbauer et. al.* auch ein wesentliches niedrigeres Verhältnis von Proteinmenge zu Adsorbensvolumen sowie ein wesentlich größeres Verhältnis von innerer Oberfläche der Versuchsanlage und Adsorbensvolumen. Es ist bei diesen Bedingungen nicht auszuschließen, dass Negativkontrollen, wie sie bei den hier vorgestellten Experimenten gemacht wurden, bei einigen Messungen von formal gleichen Systemen einen erheblichen Anteil der von *Jungbauer et. al.* postulierten partiell entfalteten Proteinen ausmachen.

In Anlehnung an die zuvor aufgestellte These sind zudem die Arbeiten der Gruppe um *Shortle et. al.* zu erwähnen. Diese Gruppe untersucht seit über 10 Jahren die Entfaltungsreaktionen der Ribonuklease von *Staphylococcus Aureus*, einem 14 kDa großen Protein, mittels NMR. Veränderungen der 3-dimensionalen Struktur wurden z.B. durch spezifische Punktmutationen des Proteins oder anorganische Lösungsmittel herbeigeführt [Ackerman et al. 2002; Ohnishi et al. 2003]. Für dieses Protein änderte sich die 3-dimensionale Struktur des Proteins bezüglich der räumlichen Ausdehnung auch bei sehr hohen Konzentrationen an chaotropen Agenzien (6M Guanidinium-Hydrochlorid) um weniger als 10% (Vortrag Carnegie Mellon University, 2004).

Es ist somit anzunehmen, dass sich die Eigenschaft eines Proteins als sterischer Hinderungsfaktor durch eine (partielle) Entfaltung nur gering ändert und die unterschiedliche Anordnung der Proteine auf den Adsorbentien die entscheidende Rolle spielt.

5 Diskussion und Ausblick

5.2.2 Experimenteller Nachweis von Strukturänderungen bei der Adsorption von Proteinen

Strukturänderungen von Proteinen bei der Adsorption auf HIC Medien wurden bereits von vielen Autoren untersucht. *Wahlgreen et. al.* [Wahlgreen et al. 1991] stellten in einem Review Artikel unterschiedliche zeitliche Regime vor, wonach die Strukturänderung meistens während, bzw. unmittelbar nach der Adsorption stattfand oder nach *Andrade et. al.* auch mehrere Stunden / Tage nach der Adsorption [Andrade 1986].

Dieses letztgenannte, experimentell anspruchsvoll zu messende Regime wurde von *Andrade et. al.* anhand der Eluierbarkeit der adsorbierten Lactoglobuline mittels Detergentien bestimmt. Strukturänderungen, die sich erst nach mehreren Stunden oder sogar Tagen vollziehen sind für die Entwicklung von präparativen chromatographischen Trennschritten allerdings ohne Bedeutung und werden daher nicht weiter diskutiert.

Der funktionelle Zusammenhang zwischen Strukturänderung des Proteins und vorhandenem Beladungsgrad in seiner Umgebung wurde bereits von mehreren Autoren postuliert, wobei sich deren experimentelle Nachweise in zwei Kategorien, indirekte und direkte Methoden, einteilen lassen.

Indirekte experimentelle Nachweismethoden

Soderquist et. al. [Soderquist et al. 1980] beluden Silikon Adsorbentien mit der gleichen Menge an den Plasmaproteinen Serumalbumin, γ -Globulin und Fibrinogen auf zwei unterschiedliche Weisen: In einem Fall wurden Teilmengen stufenweise zugegeben, im anderen Fall erfolgte die Zugabe der Gesamtmenge in einem Schritt. Bei der stufenweisen Zugabe war die erreichbare Kapazität geringer als bei der Zugabe in einem Schritt. *Soderquist et. al.* führten dies auf einen Monolayer-Beladungsmechanismus zurück, bei dem die adsorbierten Proteine bei geringerer Beladungsdichte denaturierten und mehr Platz auf den Adsorbentien einnahmen, was zu einer geringeren Gesamtbeladung bei der stufenweisen Zugabe der Proteinelösung führte. Genau dieser experimentelle Ansatz der stufenweisen Zugabe im Vergleich zur Einschnitt-Zugabe wurde in dieser Arbeit unter Verwendung des dafür konstruierten 8-Kanal-Moduls verfolgt, wie es in Kapitel

5.2 Aussagekraft der CLSM für die Charakterisierung von HIC Systemen

3.2.3. beschrieben wurde. Bedingt durch das geringe Bettvolumen des Moduls von ca. 20 μl und der Kreislaufführung der Flüssigphase wurde bei dieser Betriebsweise dieselbe örtlich homogene Beladung der Adsorbentien angenommen wie bei einem Finite Bath Experiment, d.h. einer absatzweisen Inkubation wie bei *Soderquist et. al.* beschrieben. Entlang der Bettachse konnten keine zeitlichen Beladungsunterschiede mittels der CLSM-Analyse festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Mit dem in dieser Arbeit verfolgten Ansatz der stufenweisen Adsorption von Proteinen wurden für formal gleiche experimentelle Bedingungen sehr unterschiedliche intrapartikuläre Konzentrationsprofile und Flüssigphasenkonzentrationen erhalten, wie in Kapitel 4.2.2 dargestellt. Durch diese fehlende Reproduzierbarkeit konnte ein direkter Zusammenhang zwischen Beladungsweise und Kapazität wie bei *Soderquist et. al.* nicht gefunden werden. Folglich konnte auch der potentiell darauf aufbauende Schritt in der Datenanalyse nicht vollzogen werden, unterschiedliche Kapazitäten mit entsprechend unterschiedlichen intrapartikulären Konzentrationsprofilen zu korrelieren.

Norde et. al. kamen zu einer ähnlichen Hypothese unter Verwendung derselben chromatographischen Systeme wie zuvor beschrieben [Norde 1986]. Sie verdünnten die Plasmaproteine zunehmend und untersuchten im Folgenden hauptsächlich die Elution der Proteine. Mit zunehmender Verdünnung nahm die Menge an eluierbaren Proteinen ab, was als zunehmender Mengenanteil von denaturierten und damit unter normalen Elutionsbedingungen nicht mehr eluierbaren Proteinen interpretiert wurde.

Neben der Erstellung der Massenbilanz wurden auch Verschiebungen bei Elutionsbanden genutzt, diese als denaturierte Mengenanteile an Protein zu postulieren. Das Protein α -Lactalbumin wurde unter Entzug der stabilisierenden zweiwertigen Calcium Kationen an unterschiedlich starke HIC Medien gebunden und anschliessend eluiert, worauf sich zwei Elutionsbanden bildeten. Eine Bande beinhaltete das native Protein und eine später eluierende Bande enthielt denaturierte Proteine wie von *Oroszlan et. al.* mittels Fluoreszenzspektroskopie ermittelt [Oroszlan et al. 1990]. Das Mengenverhältnis beider Proteinbanden verschob sich bei hohen Konzentrationen an Ammoniumsulfat (3 M) zu Gunsten des denaturierten Proteins mit steigender Temperatur und steigender Kontaktzeit [Wu et al. 1986; Wu et al. 1986], sowie mit zunehmender C-Atom-Kettenlänge und zunehmender Konzentration an Ammoniumsulfat [Oroszlan et al. 1990].

5 Diskussion und Ausblick

Bei den von *Jungbauer et. al.* durchgeführten Studien mit den Proteinen BSA, Ovalbumin und Lysozym handelte es sich um eine Kombination aus zwei klassischen FPLC-Säulenexperimenten [Jungbauer et al. 2005]. Im Fall von BSA wurde eine Konzentration von 3 mg ml^{-1} mit variablen Salzkonzentrationen verwendet. Desweiteren wurden für die HIC typische Prozessparameter variiert, d.h. übliche Konzentrationen von Ammoniumsulfat sowie unter anderem Butyl- und Phenyl-Sepharose HP als Adsorbensmaterial. Dieses Material ist monodispers mit einem Partikeldurchmesser von etwa einem Drittel des mittleren Durchmessers der in dieser Arbeit verwendeten Butyl- und Phenyl-Sepharose Materialien. Mit Durchbruchexperimenten wurde die Gesamtbindungskapazität des Proteins für bestimmte Prozessparameter bestimmt. Mit Pulsretentionsexperimenten wurde die Retention von $50 \mu\text{l}$ Banden bestimmt. Von diesen aufgegebenen Banden war die Gesamtmenge an Proteinen nicht mehr vollständig in dem Adsorptionspuffer eluierbar und wurde im Folgenden durch Wechsel des Laufmittels in einer zweiten Bande eluiert (vgl. Kapitel 4.2.1). Aus den Mengenverhältnissen der beiden Banden und der Gesamtkapazität aus den jeweiligen Experimenten wurden Mischisothermen für die Gesamtkapazität und die Kapazität des nativen Anteils konstruiert. Ab einer Konzentration von $1,5 \text{ M}$ Ammoniumsulfat und Kapazität von über 1 mg ml^{-1} wurde für die Proteine eine partielle Entfaltung postuliert, allerdings einhergehend mit der Annahme einer sehr schnellen Rückfaltung nach erfolgter Elution. Bei den Pulsretentionsexperimenten betrug das Verhältnis von Proteinmasse zu Adsorbensvolumen $0,15 \text{ mg Protein} / 2 \text{ mL Adsorbens}$ ($0,075 / 1$) im Vergleich zu $0,75 - 2 \text{ mg Protein} / 8 \mu\text{l Adsorbens}$ ($93 - 250 / 1$) bei den Finite Bath Experimenten. Zudem war die mit der Flüssigphase in Kontakt stehende innere Oberfläche der jeweiligen experimentellen Apparaturen bei den Pulsretentionsexperimenten mindestens um den Faktor $25 - 50$ höher. Somit ist nicht auszuschließen, dass ein erheblicher Anteil der nach *Jungbauer et. al.* partiell entfalteten Proteine in Negativkontrollen wie in dieser Arbeit verwendet als Massenverlust aufgetreten wäre.

5.2 Aussagekraft der CLSM für die Charakterisierung von HIC Systemen

Direkte experimentelle Nachweismethoden

Die Anforderung an direkte experimentelle Nachweismethoden ist die, strukturelevante Daten von Proteinen in der Flüssigphase und auf der Festphase zu analysieren. Im Optimalfall gelingt dabei die Analyse von beiden ‚Zuständen‘, sowohl gelöst in der Flüssigphase vor und/oder nach der Adsorption als auch adsorbiert auf der Festphase, mit einer experimentellen Methode. Im Folgenden werden nur die beiden Methoden diskutiert, die diesen Optimalfall ermöglichen. Zirkular Dichroismus Messungen (engl. Circular Dichroism, CD) erlauben ebenso wie die Kernspinresonanzspektroskopie (engl. Nuclear Magnetic Resonance, NMR) nur die Analyse der Proteine in der Flüssigphase und werden nicht diskutiert.

Die bis dato am erfolgreichsten eingesetzte direkte Nachweismethode stellt die Deuterium Austauschmethode mit anschließender massenspektroskopischer Analyse dar (engl. Hydrogen-Deuterium Exchange and Mass Spectrometry, HX-MS). Bei dieser von *Jones und Fernandez* eingeführten Methode wurde hauptsächlich das bereits intensiv untersuchte und oben diskutierte Protein α -Lactalbumin verwendet [Jones et al. 2003]. Wasserstoff-Atome der Amidbindungen können unter geeigneten pH- und Temperatur-Bedingungen durch Deuterium Atome ausgetauscht werden. Die Geschwindigkeit und die Menge des Deuteriumaustauschs sind bei einem stabil bleibenden Protein im Vergleich zu einem sich entfaltenden Protein unterschiedlich und können durch unterschiedliche Geschwindigkeitsgesetze ausgedrückt werden. Durch die Beschreibbarkeit der experimentellen Daten mit den entsprechenden Modellen lassen sich strukturelle Veränderungen identifizieren. So konnte für α -Lactalbumin gezeigt werden, dass stärker hydrophobe Adsorbentien ebenso wie steigende Konzentrationen an Ammoniumsulfat eine verstärkte strukturelle Entfaltung dieses Proteins im adsorbierten Zustand bedingen [Jones et al. 2003]. In weiterführenden Experimenten konnten *Fogle et. al.* für die gleichen experimentellen Systeme zeigen, dass mit zunehmender Beladung die Struktur des Proteins stabilisiert wird. Bei einer relativen Beladung von mehr als 90% der Maximalkapazität konnte der Entfaltungsprozess im adsorbierten Zustand nahezu gestoppt werden [Fogle et al. 2006].

5 Diskussion und Ausblick

Eine weitere Methode ist die Raman-Spektroskopie. Bei diesem optischen Messverfahren wird die Intensität des gestreuten Lichts einer Probe über einen gewissen Wellenlängenbereich gemessen. Die Anregung der Probe erfolgt durch monochromatisches Licht. Die ‚energiespezifischen Streuungsmuster‘ der Probe werden von einem Computerprogramm mit Referenzmustern von bekannten Strukturen verglichen, sodass somit Rückschlüsse auf die Proteinstruktur gezogen werden können. *Sane et. al.* charakterisierten ca. 12 Modellproteine bezüglich ihrer strukturellen Veränderungen bei der Adsorption auf RPC Materialien [Sane et al. 1999]. *Xiao et. al.* untersuchten strukturelle Veränderungen des Proteins α -Lactalbumin auf HIC-Systemen [Xiao et al. 2007]. Die erhaltenen Trends bestätigten die Ergebnisse der HX-MS Analysen. Zusätzlich wurden bei dieser Arbeit allerdings noch bleibende strukturelle Veränderungen nach erfolgter Adsorption auf und Elution von Phenyl Sepharose HP Medium postuliert.

5.3 Ausblick

5.3.1 Charakterisierung der strukturellen Eigenschaften der Protein-Adsorptiva

Deuterium-Austausch Massenspektroskopie zur Verifizierung der erhaltenen Modellparameter

Die von *Xiao et. al.* und *Fogle et. al.* durchgeführten HX-MS Analysen (vgl. Kapitel 5.2.2) im Finite Bath Modus könnten direkt auf die in dieser Arbeit verwendeten Systeme übertragen werden.

In einem Parallelansatz von zwei Aliquots derselben Ausgangslösungen könnten hauptsächlich die unterschiedlichen Ergebniskategorien eines Systems bezüglich struktureller Veränderungen untersucht werden. Bei Systemen, die mit dem Erweiterten Porendiffusionsmodell beschreibbar sind, würden durch die HX-MS Daten Zusatzinformationen bezüglich struktureller Veränderungen im adsorbierten Zustand erhalten. Für die Fragestellung nach dem Einfluss der potentiellen Entfaltung der Proteine auf deren Eigenschaften als sterische Hinderungsfaktoren

5.3 Ausblick

wäre allerdings nur ein ‚negatives‘ Ergebnis aus den HX-MS Experimenten eindeutig. Im Falle eines ‚positiven‘ Ergebnisses, d.h. tatsächlich stattfindender Entfaltung der Proteine, wäre der Effekt der Entfaltung auf die sterische Transportbehinderung weiterhin ungeklärt. Für eine Addressierung dieser Fragestellung müssten diese Experimente mit Untersuchungen zu der Porenzugänglichkeit von beladenen Adsorbentien kombiniert werden, wie in diesem Kapitel unten beschrieben.

Korrelation der erhaltenen Parameter mit Sekundärstrukturinformationen der Proteine im adsorbierten Zustand – Raman-Spektroskopie

Anstatt der HX-MS Messungen bietet sich die Ramanspektroskopie als komplementäre Technik an. Bezüglich der Fragestellungen und des grundsätzlichen Versuchsansatzes gilt das im vorigen Unterkapitel gesagte.

Das für die in Kapitel 5.2.2 diskutierten Untersuchungen verwendete Raman-Spektroskop verfügt über zwei Detektionskammern.

Die Mikrokammer ist praktisch der Tisch eines an das Gerät angeschlossenen Mikroskops. In dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen, mit einer analogen Fließzelle vergleichbare Versuchsbedingungen zu den CLSM Analysen im Shallow Bed Modus zu etablieren. Für die drei Proteine BSA, Mab01 und Mab02 sollten so potentielle strukturelle Veränderungen bei der Adsorption untersucht werden. Auch für die chromatographischen Systeme mit den höchsten Kapazitäten konnten keine auswertbaren Daten erhalten werden. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis lag stets bei höchstens 3 – 4,5, das Akzeptanzkriterium liegt bei >10 (Daten nicht gezeigt).

Die Makrokammer ist prinzipiell eine Abschirmvorrichtung um einen Kapillarhalter. In diesen Halter kann eine Glaskapillare eingesetzt werden, die mit dem entsprechenden Probenmaterial in gelöster, fester oder suspensierter Form gefüllt wird. Die Makrokammer ist im Strahlengang näher an der Laserquelle und ist durch wesentlich weniger Umlenkungen direkter in den Strahlengang integriert. Dadurch ist die Laserintensität, mit der das Probenmaterial konfrontiert ist, bei der Makrokammer ca. 3 x höher als bei der Mikrokammer. Die Makrokammer war

5 Diskussion und Ausblick

innerhalb des Zeitraums, in dem das Gerät für Experimente in dieser Arbeit zur Verfügung stand, allerdings nicht kalibriert und daher nicht sinnvoll einsetzbar.

Bei den in Kapitel 5.2.2 diskutierten Ergebnissen bezüglich der strukturellen Veränderung von α -Lactalbumin auf HP Sepharose wurde die Makrokammer verwendet, die erhaltenen Daten waren allerdings auf eine hohe Salzkonzentration und eine für die Messung optimale Adsorbenskapazität beschränkt.

Die Anwendung der Raman-Spektroskopie müsste sich somit auf 1-2 ausgewählte Systeme aus den 42 erhaltenen Datensätzen, vorzugsweise mit hoher Salzkonzentration, beschränken. Es bleibt allerdings weiterhin fraglich, ob mit den vorhandenen Protein-Adsorbenspaaren auswertbare Daten erhalten werden können. Die HX-MS ist demnach als Methode vorzuziehen.

Porenzugänglichkeit der Adsorbentien im beladenen Zustand

Eine Kombination einer der beiden zuvor dargestellten Nachweismethoden mit Experimenten zur Porenzugänglichkeit der Adsorbentien im beladenen Zustand würde die Fragestellung adressieren, welchen Einfluss eine potentielle strukturelle Veränderung der Proteine auf die sterische Transportbehinderung hat. Als Probenmoleküle kommen hierfür Dextran- oder Pullulan-Ketten in Frage. Diese Kohlenhydrate sind sehr hydrophil, in unterschiedlichen Größen als Standards kommerziell erhältlich und aufgrund ihrer Kettenstruktur relativ leichtgängig für sterisch komplexe Räume. Potenzielle unspezifische Wechselwirkungen mit dem Kohlenhydrat-Rückgrat der hier verwendeten Adsorbentien sind allerdings nicht auszuschließen. *To et. al.* benutzten Dextrane zur Bestimmung der Porenzugänglichkeit von unbeladenen Adsorbentien [To et al. 2007]. Für beladene Adsorbentien sind keine Studien bekannt. Erste Experimente mit unbeladenen Adsorbentien und hohen Salzkonzentrationen führten allerdings bereits zu deutlicher Retention (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse sind mit den von *To et. al.* gefundenen Ergebnissen konform (persönliche Kommunikation).

Als Kompromiss ließe sich bei den hier untersuchten Systemen die Salzkonzentration nach erfolgter Adsorption verringern, so dass bei einer optimierten Salzkonzentration wenig oder kein Protein eluiert und die Retention

der Dextrane bei den korrespondierenden Negativkontrollen ebenfalls minimiert ist.

5.3.2 Weiterführende Charakterisierung der unterschiedlichen Ergebniskategorien eines formal gleichen chromatographischen Systems

Weiterführende Untersuchungen zum Einfluss der Probenvorbereitung

Die unterschiedlichen Ergebnisse in den erhaltenen Profilen und Massenbilanzen für formal gleiche Systeme lassen sich prinzipiell auf folgende Unterschiede bei der Probenvorbereitung, dargestellt in Kapitel 3.2.1, zurückführen:

- Unterschiedliches Alter der verwendeten Adsorptionspuffer
- Unterschiedliche Lagerungsdauer der hergestellten Proteinlösungen
- Unterschiedliche Lagerungsdauer der Stammlösungen für die beiden Antikörper, bzw. des Lyophilisats für BSA

Alle anderen Parameter neben der korrekten Herstellung und Sterilfiltration der Puffer, wie Rührergeschwindigkeit des Amicon-Filtrationsmoduls oder Temperatur der Filtration, wurden konstant gelassen. Zudem wurden in der Biochemie übliche Haltbarkeitsdaten für Puffer (2-3 Wochen) und Proteinlösungen (2 Tage) eingehalten. Zur besseren Untersuchung dieser Effekte müssten Kombinationen aus Puffer-, Protein- und Stammlösungen mit variablem und exakt katalogisiertem Alter getestet werden.

Untersuchung auf Multimerbildung in der Flüssigphase mittels Dynamischer Lichtstreuung (Dynamic Light Scattering)

Wie bereits in Kapitel 5.2.1 diskutiert, lassen CLSM-Profile der Ergebniskategorie 1 auf Di- oder Multimerbildung schließen. Eine typische Messtechnik zur Addressierung dieser Fragestellung ist die DLS Messung. Diese Messungen sind allerdings nur mit unmarkierten Proteinen möglich, so dass der potentielle Einfluss der Proteinmarkierung nicht direkt untersucht werden kann. Erste Untersuchungen mit den hier verwendeten Protein-Adsorbens-Puffer-Paaren

5 Diskussion und Ausblick

ergaben keine reproduzierbaren Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Festzustellen ist in diesem Zusammenhang, dass *Jungbauer et. al.* für BSA eine Vielzahl von DLS Messdaten in einem Vortrag auf der SPICA Konferenz 2004 in Aachen präsentierten, diese Daten allerdings in der korrespondierenden Publikation nicht gezeigt wurden [Jungbauer et al. 2005].

Unspezifische Adsorption auf den verwendeten Labormaterialien

Für weitergehende Untersuchungen der unspezifischen Adsorption könnten alle verwendeten Labormaterialien, wie z.B. Schlauchmaterialien oder das Plexiglas und optische Glas der Fließzellen in gleichen Volumeneinheiten, z.B. durch einen Ausstanzer, in Finite Bath Systemen getestet werden. Durch Messungen der Gesamtproteinkonzentration sowie des D/P Gehalts zu entsprechenden Zeitpunkten ließe sich dieses Phänomen systematisch untersuchen.

6 Anhang

6.1 Parameter aus den Isothermen- und Kinetikmessungen

Tabelle 6.1: Parameter aus der Datenanpassung durch das Modell nach Langmuir sowie durch das Erweiterte Porendiffusionsmodell

Systemnamen: BU-Butyl-, PH-Phenyl- (hohe Substitutionsdichte), PL-Phenyl- (niedrige Substitutionsdichte) Sepharose FF; BSA-Rinderserumalbumin, M01/M01 monoklonaler Antikörper 01/02; NC-Natriumchlorid, AS-Ammoniumsulfat; 000-500-Salzkonzentration in mM.

Modellparameter: q_{\max} -maximale Adsorbenskapazität, K_a -Affinitätskonstante, R^2 -Regressionsgüte, k_a -Geschwindigkeitskonstante der Adsorption, Pm-Porendiffusionsmodell, $\gamma_{\text{entf}} / \gamma_{\text{nativ}}$ - Hinderungsparameter der Adsorpte in der schwächer / stärker hindernden Konfiguration, n- Exponent zur Bestimmung des Mengenanteils an Adsorpten in der stärker hindernden Konfiguration, $q_{\text{eq,rel}}$ - relative Beladung des äußeren Viertels an Adsorbenschalen

System	q_{\max} [mM]	K_a [mM ⁻¹]	R^2 [1]	k_a [mM ⁻¹ s ⁻¹]	R^2 [1]	n [1]	R^2 [1]	$q_{\text{eq,rel}}$ [%]
BUBSANC125	0.10	765.03	0.89	0.17	1.03	10.3	0.87	69
BUBSANC250	0.21	965.91	0.91	0.22	0.98	10.1	0.86	74
BUBSANC375	0.36	1079.80	0.85	0.24	0.92	10.4	0.92	81
BUBSANC500	0.48	1388.28	0.86	0.31	0.93	10.5	0.95	86
BUM02AS035	0.09	1465.09	1.01	0.33	0.93	15.2	0.91	61
BUM02AS070	0.18	3073.30	0.91	0.68	0.92	15.6	0.99	63
PHBSAAS035	0.28	730.58	0.85	0.16	1.04	0.8	0.91	64
PHBSAAS070	0.41	1134.56	1.06	0.25	1.08	0.7	0.90	69
PHBSAAS150	0.88	1937.80	0.87	0.43	0.93	0.5	0.86	78
PHBSAAS200	1.13	2960.74	0.90	0.66	1.06	0.7	0.92	85
PHBSANC125	0.20	657.67	0.89	0.15	0.90	3.1	0.87	67
PHBSANC250	0.31	895.54	0.85	0.20	1.03	2.4	0.87	69
PHBSANC375	0.54	1352.98	1.06	0.30	0.95	1.6	0.91	74
PHBSANC500	0.75	1770.00	1.00	0.40	0.92	0.9	0.85	80
PHM01AS035	0.16	1769.56	1.04	0.40	0.96	2.8	0.86	62
PHM01AS070	0.24	4237.01	0.99	0.94	0.96	2.6	0.88	66
PHM01NC125	0.07	1346.60	0.99	0.30	0.97	8.2	0.88	60
PHM01NC250	0.16	2581.53	0.90	0.57	0.99	6.9	0.87	63
PHM01NC375	0.25	3570.69	0.93	0.81	0.94	5.4	0.88	67

6 Anhang

System	q_{\max} [mM]	K_a [mM ⁻¹]	R^2 [1]	k_a [mM ⁻¹ s ⁻¹]	R^2 [1]	n [1]	R^2 [1]	$q_{\text{eq,rel}}$ [%]
PHM01NC500	0.31	4873.52	0.90	1.09	0.95	3.1	0.93	72
PHM02NC125	0.10	923.64	0.84	0.21	0.98	2.1	0.93	59
PHM02NC250	0.19	1177.31	0.90	0.26	1.07	1.7	0.93	62
PHM02NC375	0.29	2325.65	0.91	0.52	0.97	1.4	0.93	64
PHM02NC500	0.38	2890.94	0.91	0.64	1.09	1.0	0.92	67
PLBSAAS035	0.08	597.26	0.95	0.13	0.94	1.7	0.92	60
PLBSAAS070	0.17	831.46	0.90	0.19	0.94	1.8	0.93	62
PLBSAAS150	0.30	1390.76	0.87	0.31	1.02	1.4	0.87	65
PLBSAAS200	0.40	1851.62	0.98	0.42	1.08	1.7	0.89	67
PLBSANC125	0.06	568.85	1.01	0.13	1.02	6.2	0.92	59
PLBSANC250	0.15	638.94	0.99	0.14	0.97	5.0	0.86	60
PLBSANC375	0.24	958.31	0.85	0.21	0.99	3.9	0.87	62
PLBSANC500	0.31	1171.59	0.89	0.26	0.93	3.1	0.95	64
PLM01AS035	0.07	1241.90	1.04	0.28	0.91	14.7	0.85	60
PLM01AS070	0.17	2442.42	0.99	0.54	0.94	13.9	0.95	62
PLM01NC125	0.05	982.01	1.07	0.22	1.04	13.4	0.95	60
PLM01NC250	0.07	1608.23	0.96	0.36	0.94	12.1	0.98	61
PLM01NC375	0.15	2798.67	0.94	0.62	1.02	11.4	0.89	63
PLM01NC500	0.21	3058.55	0.90	0.68	1.01	9.9	0.92	65
PLM02NC125	0.08	1080.59	0.84	0.24	1.04	9.4	0.87	58
PLM02NC250	0.10	1232.69	0.92	0.27	1.06	8.0	0.97	58
PLM02NC375	0.17	1428.45	1.00	0.32	1.02	6.4	0.92	59
PLM02NC500	0.26	1691.46	0.95	0.38	0.95	5.3	0.89	59

System	$q_{\max, \text{Pm}}$ [mM]	$k_{a, \text{Pm}}$ [mM ⁻¹ s ⁻¹]	γ_{entf} [mM ⁻¹]	γ_{nativ} [mM ⁻¹]	n [1]	R^2 [1]	$q_{\text{eq,rel}}$ [%]
BUBSANC125	0.11	0.21	4.7	1558	10.3	0.87	69
BUBSANC250	0.24	0.26	8.0	2354	10.1	0.86	74
BUBSANC375	0.41	0.30	8.4	4867	10.4	0.92	81
BUBSANC500	0.56	0.37	9.9	6222	10.5	0.95	86
BUM02AS035	0.17	0.39	2.2	4843	15.2	0.91	61
BUM02AS070	0.26	0.84	3.7	7808	15.6	0.99	63
PHBSAAS035	0.37	0.20	1.3	3152	0.8	0.91	64
PHBSAAS070	0.50	0.30	4.2	4315	0.7	0.90	69
PHBSAAS150	1.13	0.52	8.2	8125	0.5	0.86	78
PHBSAAS200	1.26	0.80	9.6	9092	0.7	0.92	85
PHBSANC125	0.25	0.17	2.0	2101	3.1	0.87	67

6.1 Parameter aus den Isothermen- und Kinetikmessungen

System	$q_{\max, Pm}$ [mM]	$k_{a, Pm}$ [mM ⁻¹ s ⁻¹]	γ_{entf} [mM ⁻¹]	γ_{nativ} [mM ⁻¹]	n [1]	R ² [1]	$q_{eq, rel}$ [%]
PHBSANC250	0.37	0.24	3.6	3179	2.4	0.87	69
PHBSANC375	0.71	0.36	5.7	4266	1.6	0.91	74
PHBSANC500	0.89	0.47	7.7	5244	0.9	0.85	80
PHM01AS035	0.20	0.47	7.9	3053	2.8	0.86	62
PHM01AS070	0.29	1.14	9.0	5761	2.6	0.88	66
PHM01NC125	0.12	0.36	3.6	4366	8.2	0.88	60
PHM01NC250	0.22	0.69	5.4	6353	6.9	0.87	63
PHM01NC375	0.33	0.95	8.5	9258	5.4	0.88	67
PHM01NC500	0.42	1.34	9.4	9957	3.1	0.93	72
PHM02NC125	0.17	0.25	5.1	6486	2.1	0.93	59
PHM02NC250	0.28	0.32	8.1	6740	1.7	0.93	62
PHM02NC375	0.38	0.62	8.8	7213	1.4	0.93	64
PHM02NC500	0.59	0.76	9.6	7412	1.0	0.92	67
PLBSAAS035	0.11	0.16	3.6	1784	1.7	0.92	60
PLBSAAS070	0.21	0.22	5.4	2564	1.8	0.93	62
PLBSAAS150	0.36	0.37	8.0	3242	1.4	0.87	65
PLBSAAS200	0.52	0.50	9.7	5411	1.7	0.89	67
PLBSANC125	0.10	0.16	2.0	1051	6.2	0.92	59
PLBSANC250	0.20	0.17	2.7	1984	5.0	0.86	60
PLBSANC375	0.31	0.26	5.9	2974	3.9	0.87	62
PLBSANC500	0.42	0.31	7.9	3606	3.1	0.95	64
PLM01AS035	0.13	0.33	4.3	2553	14.7	0.85	60
PLM01AS070	0.31	0.66	5.4	4638	13.9	0.95	62
PLM01NC125	0.09	0.27	2.0	2511	13.4	0.95	60
PLM01NC250	0.12	0.43	3.7	3507	12.1	0.98	61
PLM01NC375	0.20	0.75	8.4	9076	11.4	0.89	63
PLM01NC500	0.29	0.82	9.2	9320	9.9	0.92	65
PLM02NC125	0.11	0.29	4.0	3255	9.4	0.87	58
PLM02NC250	0.14	0.33	4.6	4664	8.0	0.97	58
PLM02NC375	0.23	0.38	5.6	6497	6.4	0.92	59
PLM02NC500	0.31	0.44	7.0	8579	5.3	0.89	59

6.2 Verzeichnisse verwendeter Materialien

6.2.1 Herstellerverzeichnis

Hersteller	Abkürzung	Stadt	Land
Atoll GmbH	-	Weinheim	Deutschland
Hettich	-	Tuttlingen	Deutschland
Tecan	-	Crailsheim	Deutschland
Eppendorf	-	Hamburg	Deutschland
Varian	-	Darmstadt	Deutschland
Treff AG	-	Degersheim	Schweiz
Atto Tec	-	Siegen	Deutschland
Gilson	-	Limburg-Offheim	Deutschland
Molecular Probes (Invitrogen)	MP	Karlsruhe	Deutschland
Macherey & Nagel	-	Düren	Deutschland
GE Healthcare	GEHC	München	Deutschland
Pall	-	Dreieich	Deutschland
Tosoh	-	Stuttgart	Deutschland
FZ Jülich	-	Jülich	Deutschland
Boehringer Mannheim	BM	Mannheim	Deutschland
Sigma	-	Rödermark	Deutschland

6.2.2 Geräteverzeichnis

Bezeichnung	Typ / Modell	Hersteller
Deep Well Platten, 96er Format	PP 1,2 ml	Treff AG
Filtrationsmodul /-zelle	8400 / 8050	Millipore / Amicon
Fluoreszenz Platten, 96 Format	Fluoronunc	Nunc
FPLC-Anlage	ÄKTA Basic 10	GE Healthcare

6.2 Verzeichnisse verwendeter Materialien

Bezeichnung				Typ / Modell	Hersteller
FPLC-Anlage				ÄKTA Explorer 10	GE Healthcare
FPLC-Säule				HR 5/5	GE Healthcare
FPLC-Säule				XK 16/20	GE Healthcare
FPLC-Säule				XK 26/50	GE Healthcare
Gelkammer				X-Cell II EI9001	Novex
Horizontaler Schüttler				Teleshake 4	Variomag
HPLC-Anlage				1090	Hewlett Packard
HPLC-Säule				EC250/2 Nucleosil 100-5 C18 PP	Macherey-Nagel
HPLC-Säule				EC250/4 Nucleosil 500-5 C18 PP	Macherey-Nagel
Konfokales	Laser	Raster	Mikroskop	LSM 510	Carl Zeiss AG
Membranfilter				PLBC Dia 44,5mm	Millipore /
				NMWL 3000	Amicon
Plaqueanlage				Prototyp	FZ Jülich
Glasbodenplatte, 96er Format				Glass Bottom	Whatman
Plaqueanlage				Serienmodell Resi Quot	Atoll GmbH
Robotic Workstation				Freedom Evo 200	Tecan
Standzentrifuge				Rotanta 46 RSC	Hettich
8-Kanal-Schlauchpumpe				Minipuls 3 R8	Gilson
Tischzentrifuge				5810 R	Eppendorf
Überkopfschüttler				REAX 2	Heidolph
Thermomixer				Comfort	Eppendorf
UV / FI-Plattenphotometer				Genios Pro	Tecan
UV Platten, 96er Format				UVStar	Greiner
UV-Spektrophotometer				Cary 50 Bio	Varian
8er-Kammer-Mikrosäule				Prototyp	FZ Jülich

6 Anhang

6.2.3 Chemikalienverzeichnis

Bezeichnung	Hersteller
Ammoniumsulfat	AppliChem
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Ethanol	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka
Natriumchlorid	Merck
Silberfärbungskit Silver Xpress	Invitrogen
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	Merck
NuPage 4-12% Bis-Tris Gel	Invitrogen

6.3 Symbolverzeichnis**6.3.1 Abkürzungen**

Abkürzung	Vollständige Bezeichnung
AC	Affinitätschromatographie
AS	Ammoniumsulfat
BU	Butyl (Ligandentyp)
CD	Circular Dichroism [engl.], Zirkulärer Dichroismus
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy [engl.], Konfokale Laser Raster Mikroskopie
const.	konstant
D/P	Mengenquotient aus Fluorophor und Protein
DLS	Dynamic Light Scattering [engl.], Dynamische Lichtstreuung
DoE	Design of Experiments [engl.], statistisch basierte Methode für die experimentelle Planung
engl.	englisch

6.3 Symbolverzeichnis

Abkürzung	Vollständige Bezeichnung
et. al.	et alia [lat.], und andere
FI	Fluoreszenzintensität
GA	Größenausschlusschromatographie
Gl.	Gleichung
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HX-MS	Hydrogen-Deuterium Exchange and Mass Spectrometry [engl.], Wasserstoff-Deuterium Austausch und Massenspektrometrie
IA	Ionenaustauschchromatographie
ICH	International Conference on Harmonization [engl.], Gemeinsames Gremium der nationalen Arzneimittel- Aufsichtsbehörden
IEC	Ion Exchange Chromatography [engl.], Ionenaustauschchromatographie
IgG	Immunoglobulin G
k	Kilo (10^3)
lat.	lateinisch
NC	Natriumchlorid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance [engl.], Kernspinresonanz
OC	Octyl (Ligandentyp)
p. a.	Pro analysis, Reinheitsgrad von Chemikalien
PH	Phenyl High [engl.], Phenyl (Ligandentyp), niedrige Substitutionsdichte
pI	Isoelektrischer Punkt
PL	Phenyl Low [engl.], Phenyl (Ligandentyp), hohe Substitutionsdichte
QbD	Quality by Design [engl.], spezielles Zulassungsverfahren für Pharmazeutika
RP-HPLC	Reverse Phase – High Performance Liquid Chromatography [engl.], Reverse Phase Hochleistungsflüssigchromatographie
SEC	Size Exclusion Chromatography [engl.], Größenausschluss- chromatographie
SMA	Steric Mass Action Modell, Mechanistisches Modell zur

6 Anhang

Abkürzung	Vollständige Bezeichnung
	Beschreibung von Ionenaustauschchromatographie
SP	Sulfopropyl (Ligandentyp)
SRM	Surface Response Mapping [engl.], statistisch basierte Methode zur Stabilitätsprüfung eines Systems
UV	Ultraviolett

6.3.2 Lateinische Symbole

Symbol	Einheit	Bedeutung
A	[cm ⁻¹]	Absorption
a ₀	[-]	Mengenverhältnis von markiertem Protein-Adsorpt: Partikelmitte / Partikelrand
c	[mg ml ⁻¹], [mM]	Adsorptivkonzentration in der Flüssigphase
D	[m ² s ⁻¹]	Diffusionskoeffizient
Da	[kg mol ⁻¹]	Dalton, Molekulare Masse
G	[J]	<i>Gibbs</i> -Energie
\overline{G}_i	[J mol ⁻¹]	Partielle molare <i>Gibbs</i> -Energie
I	[AU]	Lichtintensität
\overline{I}	[-]	Normierte Lichtintensität
J	[mol m ⁻² s ⁻¹]	Stofffluss
k	[J K ⁻¹]	<i>Boltzmann</i> -Faktor, Stoßzahl
K	[N]	Kraft
k'	[-]	Retentionsfaktor
K _a	[ml mg ⁻¹], [mM ⁻¹]	Affinitätskonstante der <i>Langmuir</i> -Gleichung
k _{ads}	[ml mg ⁻¹ s ⁻¹], [mM ⁻¹ s ⁻¹]	Geschwindigkeitskonstante der Adsorption
K _d	[mg ml ⁻¹], [mM]	Dissoziationskonstante der <i>Langmuir</i> -Gleichung
k _{des}	[s ⁻¹]	Geschwindigkeitskonstante der Desorption
k _{film}	[m s ⁻¹]	Filmdiffusionskoeffizient
l	[m]	Weglänge
m	[kg]	Masse

6.3 Symbolverzeichnis

Symbol	Einheit	Bedeutung
m_m	[Da], [kg mol ⁻¹]	Molekulare Masse
n	[mol]	Stoffmenge
p	[Pa]	Druck
pK	[-]	Negativer dekadischer Massenwirkungskoeffizient
q	[mg ml ⁻¹], [mM]	Adsorptivkapazität
q_{max}	[mg ml ⁻¹], [mM]	Maximale Adsorbenskapazität
\bar{q}_r	[-]	Normierte radiale Kapazität
R	[J K ⁻¹ mol ⁻¹]	Universelle Gaskonstante
r	[μm]	Radius
\bar{r}	[-]	Normierter Radius
R_p	[μm]	Partikelradius
t	[s], [min]	Zeit
T	[K]	Absolute Temperatur
u	[m s ⁻¹]	Geschwindigkeit
V	[ml]	Volumen
x	[m] / [-]	Ortskoordinate / Molenbruch
\bar{x}	[-]	Normierte, dimensionslose Ortskoordinate
y	[m]	Ortskoordinate
z	[m] / [-]	Ortskoordinate / (Ionische) Ladung
\bar{z}	[-]	Normierte Ortskoordinate

6.3.3 Griechische Symbole

Symbol	Einheit	Bedeutung
∂	[-]	Differential
δ	[nm]	Fluidfilmdicke
μ	[J mol ⁻¹]	Chemisches Potential
ς	[-]	Reibungskoeffizient
τ	[-]	Porentortuosität
λ	[nm]	Wellenlänge

6 Anhang

Symbol	Einheit	Bedeutung
γ	$[\text{ml mol}^{-1}]$	Hinderungsparameter
ε	$[-] / [\text{ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$	Partikelporosität, Extinktionskoeffizient
Φ	$[-]$	(Licht-)Quantenausbeute
α	$[\text{mg ml}^{-1}]$	Umrechnungsfaktor
η	$[\text{Pa s}]$	Dynamische Viskosität
ζ_{Ads}	$[\text{ml}]$	Fehler bei der Adsorbensaliquotierung
ζ_{B}	$[\text{ml}]$	Pipettierfehler beim Transfer der Bulk-Flüssigphase
Δ	$[-]$	Differenz

6.3.4 Indices

Symbol	Bedeutung
∞	Ideal (unendlich) verdünnte Lösung
0	Anfangswert
1	Lösungsmittel
2	Adsorbiertes Protein
3	Gelöstes Protein
Ads	Adsorbens
ads	Adsorption
an	Anregung
B	Bulk-Flüssigphase
BR	Bilanzraum
des	Desorption
eff	effektiv
em	Emission
ges	gesamt
i, j	Stoffkomponenten (allgemein)
IS	Ionenstärke
m	Molspezifisch, molar
max	maximal

6.3 Symbolverzeichnis

Symbol	Bedeutung
P	Partikel(-rand) / Pore
r	radial
S	Säure / (Adsorbens-)schale
V	Volumetrisch, volumenspezifisch

7 Literaturverzeichnis

Ackerman, M. S. and D. Shortle (2002). "Robustness of the long-range structure in denatured staphylococcal nuclease to changes in amino acid sequence." Biochemistry **41**(46): 13791-7.

Andrade, J. D. (1986). "Symposium on Protein and Polyelectrolyte Adsorption." Journal of Colloid and Interface Science **111**.

Anspach, F. B., D. Petsch, et al. (1996). "Purification of murine IgG1 on group specific affinity sorbents." Bioseparation **6**(3): 165-84.

Arakawa, T. and Y. Kita (1999). "Protection of bovine serum albumin from aggregation by Tween 80." Journal of Pharmaceutical Sciences **89**(5): 646-51.

Bensch, M., P. Schulze-Wierling, et al. (2005). "High Throughput Screening of Chromatographic Phases for Rapid Process Development." Chemical Engineering Technology **28**(11): 10.

Bigelow, C. C. (1967). "On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure." J Theor Biol **16**(2): 187-211.

Brauer, H. (1971). Grundlagen der Einphasen- und Mehrphasenströmungen. Arau, Frankfurt am Main, Verlag Sauerländer.

Britsch L., S. T., Friedle J. (2007). High throughput chromatographic separations at small scale in a liquid handling workstation. ISPPP. Orlando, FL.

Bromley, E. H. and I. Hopkinson (2002). "Confocal microscopy of a dense particle system." J Colloid Interface Sci **245**(1): 75-80.

Brooks, C. A. and S. M. Cramer (1992). "Steric Mass Action Ion Exchange: Displacement Profiles and Induced Salt Gradients." American Institute of Chemical Engineers **38**(12): 1969-78.

Brown, R. (1828). "A brief Account of Microscopical Observations made in the Months of June, July, and August, 1827, on the Particles contained in the Pollen of

7 Literaturverzeichnis

Plants; and on the general Existence of active Molecules in Organic and Inorganic Bodies." Philosophical Magazine N.S. **4**: 161-173.

Buschmann, V., K. D. Weston, et al. (2003). "Spectroscopic study and evaluation of red-absorbing fluorescent dyes." Bioconj Chem **14**(1): 195-204.

Carta, G., A. R. Ubiera, et al. (2005). "Protein Mass Transfer Kinetics in Ion Exchange Media: Measurements and Interpretations." Chemical Engineering & Technology J. **28**(11): 1252-64.

Chen, W.-D., X.-Y. Dong, et al. (2002). "Dependence of pore diffusivity of protein on adsorption density in anion-exchange adsorbent " Biochemical Engineering Journal **14**(1): 45-50.

Collins, K. D. and M. W. Washabaugh (1985). "The Hofmeister effect and the behaviour of water at interfaces." Q Rev Biophys **18**(4): 323-422.

Conder, J. R. and B. O. Hayek (2000). "Adsorption kinetics and equilibria of bovine serum albumin on rigid ion-exchange and hydrophobic interaction chromatography matrices in a stirred cell." Biochem Eng J **6**(3): 215-223.

Dismer, F., M. Petzold, et al. (2008). "Effects of ionic strength and mobile phase pH on the binding orientation of lysozyme on different ion-exchange adsorbents." J Chromatogr A **1194**(1): 11-21.

Dziennik, S. R. (2002). Effects of Ionic Strength and Stationary Phase on Protein Adsorption and Transport in Ion-Exchange Particles. Department of Chemical Engineering. Delaware, University of Delaware: 308.

Ebbinghaus, S., S. J. Kim, et al. (2007). "An extended dynamical hydration shell around proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(52): 20749-20752.

Edelhoch, H. (1967). "Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins." Biochemistry **6**(7): 1948-54.

Flickinger, M., Drew, SW (1999). Encyclopedia of Bioprocess Technology - Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation. New York, Wiley-VCH.

7 Literaturverzeichnis

- Fogle, J. L., J. P. O'Connell, et al. (2006). "Loading, stationary phase, and salt effects during hydrophobic interaction chromatography: alpha-lactalbumin is stabilized at high loadings." J Chromatogr A **1121**(2): 209-18.
- Fraczkiewicz, R., Braun, W. (1998). "Exact and efficient Analytical Calculation of the Accessible Surface Area and their Gradients for Macromolecules." Journal of Computational Chemistry **19**(3): 319-33.
- Garke, G., W. D. Deckwer, et al. (2000). "Preparative two-step purification of recombinant human basic fibroblast growth factor from high-cell-density cultivation of Escherichia coli." J Chromatogr B Biomed Sci Appl **737**(1-2): 25-38.
- Gill, S. C. and P. H. von Hippel (1989). "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data." Anal Biochem **182**(2): 319-26.
- Guiochon, G. and B. Lin (2003). Modeling for Preparative Chromatography. San Diego, Academic Press.
- Heinemann, M., U. Limper, et al. (2004). "New insights in the spatially resolved dynamic pH measurement in macroscopic large absorbent particles by confocal laser scanning microscopy." J Chromatogr A **1024**(1-2): 45-53.
- Herrmann, T., M. Schröder, et al. (2006). "Generation of equally sized particle plaques using solid-liquid suspensions." Biotechnol Prog **22**(3): 914-8.
- Hofmeister, F. (1888). "Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Zweite Mitteilung. Über Regelmäßigkeiten in der eiweißfällenden Wirkung der Salze und ihre Beziehung zum physiologischen Verhalten derselben." Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie (Leipzig) **24**: 247-60.
- Holland, D. J., A. J. Sederman, et al. (2004). "Quantitative magnetic resonance imaging of urea and lysozyme in protein chromatography." Journal of Chromatography A **1033**(2): 311-319.
- Hubbuck, J., T. Linden, et al. (2002). "Dynamics of protein uptake within the adsorbent particle during packed bed chromatography." Biotechnol Bioeng **80**(4): 359-68.

7 Literaturverzeichnis

Hunter, A. K. and G. Carta (2000). "Protein adsorption on novel acrylamido-based polymeric ion exchangers. II. Adsorption rates and column behavior." J Chromatogr A **897**(1-2): 81-97.

Iyer, H., S. Tapper, et al. (1999). "Use of the steric mass action model in ion-exchange chromatographic process development." J Chromatogr A **832**: 1-9.

J. A. Wesselingh, J. C. B. (2001). "Protein ion-exchange adsorption kinetics." AIChE Journal **47**(7): 1571-1580.

Janson, J.-C., Ryden, L (1997). Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Application, Wiley-VCH.

Joneckis, C., Amador-Toro, Diana (2006). Q9 Quality Risk Management. F. D. Administration, Office of Communication, Training and Manufacturers Assistance, HFM-40. **Q9**.

Jones, T. T. and E. J. Fernandez (2003). " α -Lactalbumin tertiary structure changes on hydrophobic interaction chromatography surfaces." Journal of Colloid and Interface Science **259**(1): 27-35.

Jones, T. T. and E. J. Fernandez (2004). "Hydrophobic interaction chromatography selectivity changes among three stable proteins: conformation does not play a major role." Biotechnol Bioeng **87**(3): 388-99.

Jungbauer, A., C. Machold, et al. (2005). "Hydrophobic interaction chromatography of proteins. III. Unfolding of proteins upon adsorption." J Chromatogr A **1079**(1-2): 221-8.

Kaczmariski, K. and J. C. Bellot (2003). "Effect of Particle-Size Distribution and Particle Porosity Changes on Mass-Transfer Kinetics." Acta Chromatographia **13**: 45-50.

Kökpınar, Ö., D. Harkensee, et al. (2006). "Innovative Modular Membrane Adsorber System for High-Throughput Downstream Screening for Protein Purification." Biotechnology Progress **22**(4): 1215-9.

Kopaciewicz, W., M. Rounds, et al. (1983). "Retention Model for High-Performance Ion-Exchange Chromatography." J Chromatogr **266**: 3-21.

7 Literaturverzeichnis

- Kümmel, R., Worch, E. (1990). Adsorption aus wässrigen Lösungen. Leipzig, Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie.
- Lakowicz, J. R. (2006). Principles of fluorescence spectroscopy. New York, Springer.
- Langmuir, I. (1916). "The constitution and Fundamental Properties of Solids and Liquids." J Am Chem Soc **38**: 2221-95.
- Leonard, E. J. and A. Skeel (1985). "Disposable microliter immunoabsorbent columns: construction and operation." J Immunol Methods **82**(2): 341-8.
- Levan, M. D., L. Ryden, et al. (1997). Perry's Chemical Engineers' Handbook. D. W. Green. New York, McGraw-Hill.
- Lewus, R. K. and G. Carta (1999). "Protein diffusion in charged polyacrylamide gels. Visualization and analysis." J Chromatogr A **865**(1-2): 155-68.
- Lienqueo, M. E., A. Mahn, et al. (2007). "Current insights on protein behaviour in hydrophobic interaction chromatography." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **849**(1-2): 53-68.
- Linden, T. (2001). Untersuchungen zum Inneren Transport bei der Proteinadsorption an poröse Medien mittels konfokaler Laser Raster Mikroskopie. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät. Düsseldorf, Heinrich Heine Universität: 270.
- Ljunglof, A. and R. Hjorth (1996). "Confocal microscopy as a tool for studying protein adsorption to chromatographic matrices." Journal of Chromatography A **743**(1): 75-83.
- Ljunglof, A. and J. Thommes (1998). "Visualising intraparticle protein transport in porous adsorbents by confocal microscopy." Journal of Chromatography A **813**(2): 387-395.
- Luck, W. A. P. (1985). The influence of ions on water structure and on aqueous systems. Water and Ions in Biological Systems. A. Pullmann, Vasilescu, V., Packer, L. New York, Plenum Press: 95-126.

7 Literaturverzeichnis

Malmsten, M., K. Xing, et al. (1999). "Confocal Microscopy Studies of Trypsin Immobilization on Porous Glycidyl Methacrylate Beads." J Colloid Interface Sci **220**(2): 436-442.

Melander, W. and C. Horvath (1977). "Salt effect on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series." Arch Biochem Biophys **183**(1): 200-15.

Melander, W. R., D. Corradini, et al. (1984). "Salt-mediated retention of proteins in hydrophobic-interaction chromatography. Application of solvophobic theory." J Chromatogr **317**: 67-85.

Moheb Nasr, C. J. (2008). Q8R1 Pharmaceutical Development Revision 1. F. a. D. Administration, Office of Communication, Training and Manufacturers Assistance, HFM-40. **ICH Q8**: 16.

Nic, M., Jirat, J, Kosata, B (2006). Compendium of Chemical Terminology (Gold Book), IUPAC. **2007**.

Norde, W. (1986). "Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface." Advances in Colloid and Interface Science **25**: 267-340.

Ohnishi, S. and D. Shortle (2003). "Effects of denaturants and substitutions of hydrophobic residues on backbone dynamics of denatured staphylococcal nuclease." Protein Sci **12**(7): 1530-7.

Oroszlan, P., R. Blanco, et al. (1990). "Intrinsic fluorescence studies of the kinetic mechanism of unfolding of alpha-lactalbumin on weakly hydrophobic chromatographic surfaces." J Chromatogr **500**: 481-502.

Pace, C. N., F. Vajdos, et al. (1995). "How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein." Protein Sci **4**(11): 2411-23.

Perkins, T., D. Mak, et al. (1997). "Protein retention in hydrophobic interaction chromatography: modeling variation with buffer ionic strength and column hydrophobicity." Journal of Chromatography A **766**(1-2): 1-14.

Rege, P. (2006). "High-throughput process development for recombinant protein purification." Biotechnology and Bioengineering **93**(4): 618-30.

7 Literaturverzeichnis

Roque, A. C., C. R. Lowe, et al. (2004). "Antibodies and genetically engineered related molecules: production and purification." Biotechnol Prog **20**(3): 639-54.

Rosenbaum, T. and J. Hubbuch (2003). Untersuchung von Ionenaustauschermaterialien zur Proteintrennung mittels konfokaler Laser Raster Mikroskopie. Forschungszentrum Jülich, Institut für Biotechnologie 2. Jülich, Fachhochschule Aachen.

Sane, S. U., S. M. Cramer, et al. (1999). "A holistic approach to protein secondary structure characterization using amide I band Raman spectroscopy." Anal Biochem **269**(2): 255-72.

Schmidt-Traub, H. (2005). Preparative chromatography of fine chemicals and pharmaceutical agents, Wiley-VCH.

Scopes, R. (1994). Protein Purification. Principles and Practice. New York, Springer.

Shalliker, R. A., B. S. Broyles, et al. (1998). "Visualization of solute migration in liquid chromatography columns." Journal of Chromatography A **826**(1): 1-13.

Shalliker, R. A., B. S. Broyles, et al. (1999). "Visualization of viscous fingering in high-performance liquid chromatographic columns: Influence of the header design." Journal of Chromatography A **865**(1-2): 73-82.

Smeds, A.-L. (1999). Process for purification of Factor VIII. United States Patent. USA, Genetics Institute, Inc. **US0060005082A**.

Soderquist, M. E. and A. G. Walton (1980). "Structural changes in proteins adsorbed on polymer surfaces." Journal of Colloid and Interface Science **75**(2): 386-397.

Staby, A., R. H. Jensen, et al. (2007). "Comparison of chromatographic ion-exchange resins VI. Weak anion-exchange resins." J Chromatogr A **1164**(1-2): 82-94.

Susanto, A. (2006). Untersuchung und Modellierung intrapartikulärer Stofftransportmechanismen bei der Proteinaufreinigung durch Ionenaustauschchromatographie. Lehrstuhl für Anlagentechnik. Dortmund, Universität Dortmund. **3**: 146.

7 Literaturverzeichnis

- Susanto, A., T. Herrmann, et al. (2006). "Short-cut method for the correction of light attenuation influences in the experimental data obtained from confocal laser scanning microscopy." J Chromatogr A **1136**(1): 29-38.
- Susanto, A., T. Herrmann, et al. (2007). "Investigation of pore diffusion hindrance of monoclonal antibody in hydrophobic interaction chromatography using confocal laser scanning microscopy." J Chromatogr A **1149**(2): 178-88.
- Suzuki, M. and J. Smith (1972). "Axial dispersion in beds of small particles." Chemical Engineering J. **3**: 256-264.
- Tallarek, E., E. Rapp, et al. (2003). "Quantitative Study of Electrokinetic Transport in Porous Media by Confocal Laser Scanning Microscopy." Langmuir **19**(11): 4523-4866.
- Teske, C. A., M. Schroeder, et al. (2005). "Protein-labeling effects in confocal laser scanning microscopy." J Phys Chem B **109**(28): 13811-7.
- Teske, C. A., R. Simon, et al. (2007). "Changes in retention behavior of fluorescently labeled proteins during ion-exchange chromatography caused by different protein surface labeling positions." Biotechnol Bioeng **98**(1): 193-200.
- Teske, C. A., E. von Lieres, et al. (2006). "Competitive adsorption of labeled and native protein in confocal laser scanning microscopy." Biotechnol Bioeng **95**(1): 58-66.
- To, B. C. and A. M. Lenhoff (2007). "Hydrophobic interaction chromatography of proteins. I. The effects of protein and adsorbent properties on retention and recovery." J Chromatogr A **1141**(2): 191-205.
- Tscheliessnig, A., R. Hahn, et al. (2005). "In situ determination of adsorption kinetics of proteins in a finite bath." J Chromatogr A **1069**(1): 23-30.
- Tyn, M. and T. Gusek (1990). "Prediction of diffusion coefficients of proteins." Biotechnology and bioengineering **35**(4): 327-338.
- Vedantham, G., H. G. Sparks, et al. (2000). "A holistic approach for protein secondary structure estimation from infrared spectra in H(2)O solutions." Anal Biochem **285**(1): 33-49.

7 Literaturverzeichnis

Wahlgreen, M. and T. Arnebrant (1991). "Protein adsorption to solid surfaces." TIBTECH **9**: 201-8.

Walsh, G. (2005). "Biopharmaceuticals: recent approvals and likely directions." Trends Biotechnol **23**(11): 553-8.

Washabaugh, M. W. and K. D. Collins (1986). "The systematic characterization by aqueous column chromatography of solutes which affect protein stability." J Biol Chem **261**(27): 12477-85.

Weaver, L. E. and G. Carta (1996). "Protein Adsorption on Cation Exchangers: Comparison of Macroporous and Gel-Composite Media." Biotechnol. Prog. **12**(3): 342-355.

Wesseling, J. A. and R. Krishna (2000). Mass transfer in multicomponent mixtures., Delft University Press.

Wiendahl, M., P. S. Wierling, et al. (2008). "High Throughput Screening for the Design and Optimization of Chromatographic Processes – Miniaturization, Automation and Parallelization of Breakthrough and Elution Studies." Chem. Eng. Technol. **31**(6): 893-903.

Wu, S. L., K. Benedek, et al. (1986). "Thermal behavior of proteins in high-performance hydrophobic-interaction chromatography. On-line spectroscopic and chromatographic characterization." J Chromatogr **359**: 3-17.

Wu, S. L., A. Figueroa, et al. (1986). "Protein conformational effects in hydrophobic interaction chromatography. Retention characterization and the role of mobile phase additives and stationary phase hydrophobicity." J Chromatogr **371**: 3-27.

Xiao, Y., T. T. Jones, et al. (2007). "Protein instability during HIC: hydrogen exchange labeling analysis and a framework for describing mobile and stationary phase effects." Biotechnol Bioeng **96**(1): 80-93.